

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA**

**DIVERSIDADE MICROBIANA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS
PROVENIENTES DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA DO BAIXO AMAZONAS**

WENDERSON DOS SANTOS CID

ITACOATIARA- AM

2015

WENDERSON DOS SANTOS CID

**DIVERSIDADE MICROBIANA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS
PROVENIENTES DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA DO BAIXO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia.

Área de concentração: Agrobioenergia, análise e manejo de recursos amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg

ITACOATIARA- AM

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Cid, Wenderson dos Santos

C568d Diversidade microbiana e atividade enzimática de fungos provenientes de Terra Preta Antropogênica do Baixo Amazonas / Wenderson dos Santos Cid. 2015

96 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maxwell Adriano Abegg

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. 16s rRNA. 2. 18s rRNA. 3. Bactérias. 4. Enzimas. 5. PCR-DGGE. I. Abegg, Maxwell Adriano II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

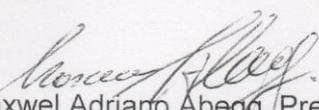
WENDERSON DOS SANTOS CID

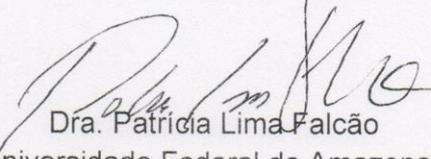
Diversidade Microbiana e Atividade Enzimática de
Leveduras e Fungos Semelhantes a Leveduras de
Terra Preta Antropogênica de Parintins - AM

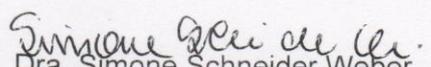
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 30 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Maxwell Adriano Abegg, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Dra. Patricia Lima Falcão
Universidade Federal do Amazonas


Dra. Simone Schneider Weber
Universidade Federal do Amazonas

Dedico aos meus pais, pelos ensinamentos que me proporcionaram a integridade.

A Deus, porque nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos nele.

Ao Professor Dr. Maxwell Adriano Abegg pela paciência, confiança e compreensão.

Aos meus pais Wanderley Ferreira Cid e Rosinei dos Santos Cid por todos os ensinamentos que até hoje norteiam minha vida.

A toda minha família que mesmo estando longe, sempre direcionaram votos de apoio, em especial agradecer por duas pessoas maravilhosas que considero meus pais avós *Raimunda Cid* e *Roque Cid*.

A Rosely Ferreira Cid.

A Carlos José Ferreira Cid "*in memoriam*".

A minha *Emily Katarine Ferreira Vale* por sua companhia, compreensão e amor.

Ao e Dra. Patrícia Lima Falcão e Dra. Simone Schneider Weber pela presença e colaboração nesta defesa de mestrado.

Ao Dr. Aristóteles de Jesus Teixeira Filho pela contribuição no exame de qualificação e pelos cálculos dos atributos químicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos - PGCTRA.

A FAPEAM pela concessão da bolsa.

A todos que de forma direta ou indiretamente estão colaborando para a execução deste trabalho.

“Ame a sabedoria e ela o tornará importante, abraça-a e você será respeitado”.

Provérbios 4

RESUMO

A Terra Preta Antropogênica (TPA) apresenta-se na forma de pequenas manchas distribuídas aleatoriamente, sobretudo na Amazônia Central e Oriental. Sua denominação, bem como suas características únicas são decorrentes de ação antrópica de civilizações indígenas que viveram nestes sítios arqueológicos. A grande quantidade de matéria orgânica estável presente nestes sítios arqueológicos é oriunda das lixeiras indígenas onde restos de animais, vegetais, dejetos fecais, corpos humanos, fragmentos cerâmicos, artefatos líticos e carvão pirogênico foram depositados. Dentre os microrganismos presentes neste solo, as leveduras desempenham papel fundamental na indústria bem como no ambiente. Este grupo está correlacionado a processos fermentativos de diversos tipos de açúcares, produção de vitaminas, enzimas, e fatores extracelulares micocinogênicos. O objetivo deste trabalho é avaliar a diversidade de microrganismos presentes na TPA através de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE), relacionando os resultados com as características físico-químicas do solo. Além disso, testes de tolerância a altas temperaturas, glicose e etanol, produção de enzimas e de micotoxinas foram realizados buscando selecionar isolados com possível potencial biotecnológico. Foram obtidos 88 (oitenta e oito) isolados leveduriformes. Destes, nenhum suportou a temperatura de 50°C ou foi tolerante a 50% de glicose no meio, e 5 (cinco) isolados (5,7%) toleraram 30% de etanol no meio. Dos 88 isolados, 13 (treze) isolados (14,8%) apresentaram atividade amilolítica, 25 (vinte e cinco) isolados (22%) foram fortemente positivos para produção de caseinase e 13 (treze) isolados (14,8%) apresentaram atividade ótima para a produção de gelatinase. Ainda, 66 (sessenta e seis) isolados (75%) foram positivos para a produção da enzima celobiase e 49 (quarenta e nove) isolados (55,7%) foram positivos para enzima esterase. Para avaliar a atividade micocinogênica, os 88 isolados foram testados frente a cepas de *Candida krusei* e *Candida albicans*. Nenhum isolado apresentou atividade frente a *C. krusei* e 22 (vinte e dois) isolados (25%) apresentaram atividade frente a *C. albicans*. A região 16S do rRNA (região V6-V8) foi sequenciada para a identificação de procariotos e a região 18S do rRNA e do espaçador interno transcrito (ITS) para a identificação de eucariotos. Os perfis de PCR-DGGE da região 18S do rRNA e ITS identificaram gêneros de leveduras e fungos filamentosos. Os gêneros encontrados para bactérias foram: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Leuconostoc* e actinobactérias, como *Streptomyces* e *Microbacterium*. Na comunidade fúngica, foi observada a presença de *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Candida*, *Penicillium* e ascomicetos e zigomicetos não cultiváveis. O valor de pH do solo foi de 6,2. O solo apresentou importantes níveis de minerais, com exceção de sódio (não detectado) e alumínio (~0,1 cmol/dm³). A matéria orgânica foi encontrada na concentração de 3,84 dag/kg. Alguns grupos de microrganismos ainda não haviam sido previamente associados com solo de TPA. A diversidade microbiana observada associada aos resultados químicos que

demonstram fertilidade elevada deste solo indicam que o mesmo pode ser fonte de microrganismos de interesse.

Palavras – chave: 16S do rRNA, 18S do rRNA, bactérias, enzimas, PCR – DGGE.

ABSTRACT

The Anthropogenic Dark Earth (TPA) is presented in the form of small spots randomly distributed, especially in central and eastern Amazon. Denominations, as well as its unique characteristics, are due to human action of indigenous civilizations that lived in these archaeological sites. The large amount of stable organic matter present in these archaeological sites comes from the indigenous dumps where remains of animals, vegetables, fecal waste, human bodies, ceramic fragments, lithic artifacts and pyrogenic carbon were deposited. Among the microorganisms present in this soil, yeasts play a key role in the industry and the environment. This group is correlated with fermentation processes of various types of sugars, production of vitamins, enzymes, extracellular factors micocinogênicos. The objective of this study is to evaluate the diversity of microorganisms in TPA using electrophoresis on denaturing gradient gel (PCR-DGGE), relating the results with the physico-chemical characteristics of the soil. In addition, tolerance test at high temperatures, glucose and ethanol production enzymes and mycotoxins were conducted to select strains with possible biotechnological potential. We obtained 88 (eighty eight) isolated yeast. Of these, none bore the temperature was 50 ° C or tolerant to 50% glucose medium, and five (5) isolates (5.7%) 30% ethanol tolerated in the middle. Of the 88 isolates, thirteen (13) isolates (14.8%) had great activity for the production of amylase activity, 25 (twenty five) isolates (22%) were strongly positive for production caseinase and thirteen (13) isolates (14.8%) had great activity for the production of gelatinase. Still, 66 (sixty-six) isolates (75%) were positive for production of the enzyme cellobiase and (55.7%) were positive for esterase enzyme. To evaluate the mycocinogenic activity, 88 isolates were tested against strains of *Candida krusei* and *Candida albicans*. No isolate showed activity against *C. krusei* and 22 (twenty two) isolates (25%) showed activity against *C. albicans*. A 16S rRNA region (V6-V8 region) was sequenced for identification of prokaryotic and 18S rRNA region and the internal transcribed spacer (ITS) for identifying eukaryotes. The PCR-DGGE profiles of 18S rRNA region and ITS identified genera of yeast and filamentous fungi. The genera found for bacteria were *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Leuconostoc* and actinomycetes, as *Streptomyces* and *Mycobacterium*. In fungal community, we observed the presence of *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Candida*, *Penicillium* and Zygomycetes ascomycetes and uncultured. The pH value of the soil was 6.2. The soil had high levels of minerals, sodium except for (not detected) and aluminum (~ 0.1 cmol / dm³). The organic matter was found at a concentration of 3.84 dag / kg. Some groups of microorganisms had not been previously associated with soil TPA. Microbial diversity observed associated with chemical results demonstrate that high fertility of the soil, suggest that the same can be a source of microorganisms of interest.

Key-words: 16SrRNA, 18SrRNA, bacteria, enzymes, PCR–DGGE

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A)** Perfil de solo de Terra Preta Antropogênica (coloração escura); **B)** Fragmentos cerâmicos e artefatos indígenas em Terra Preta Antropogênica.....**21**
- Figura 2 -** Mapa de Terras Pretas Antropogênicas no Brasil destacando a incidência desses solos em interflúvios de rios.....**21**
- Figura 3 -** Wim Sombroek (1934-2003).....**23**
- Figura 4 - A)** Imagem por microscopia fluorescente e **B)** confocal, demonstram presença de microrganismos em superfícies de carvão pirogênico de Terra Preta Antropogênica.....**24**
- Figura 5 -** Localização do sítio arqueológico de Terra Preta Antropogênica de Parintins-AM**28**
- Figura 6 -** Esquema gráfico de coleta de amostras de solo de TPA considerando o horizonte A antrópico (HA)**29**
- Figura 7 - A)** Imagem da área de coleta de Terra Preta Antropogênica do sítio arqueológico de Parintins e **B)** Coleta do solo de Terra Preta Antropogênica.....**38**
- Figura 8 - A)** Vista do ponto de coleta do solo de Terra Preta Antropogênica e **B)** Presença de cerâmicas no solo de Terra Preta Antropogênica.....**35**
- Figura 9 –** Macromorfologia de leveduras isoladas de Terra Preta Antropogênica destacando a variação de cor, superfície e margem das cepas leveduriformes.....**46**
- Figura 10 –** Micromorfologia de leveduras isoladas de Terra Preta Antropogênica.....**46**

Figura 11 – A figura mostra um plaqueamento clássico, ressaltando a bela diversidade microbiana presente no solo de Terra Preta Antropogênica de Parintins – Am, destacando a variação de cor, superfície e formas das colônias leveduriformes.....	47
Figura 12 - Teste tolerância ao etanol 30% em placa	48
Figura 13 - Teste positivo para produção da enzima gelatinase por isolado leveduriforme TPA1014, e amostra negativa para produção da enzima por isolado leveduriforme TPA 1015	45
Figura 14 - A figura mostra o teste em placa para produção de amilase, dando destaque a formação do halo que torna – se visível após a aplicação do lugol, sendo o indicativo principal para a produção da enzima.....	52
Figura 15 - Teste para produção da enzima caseinase com isolados leveduriformes obtidos de Terra Preta Antropogênica. A) Cepa controle positivo <i>E. coli</i> ; B) Cepa controle positivo <i>Bacillus subtilis</i> ; C) Cepa controle positivo <i>Bacillus cereus</i> ; D) Cepa TPA1021 positiva para enzima; E) Cepa TPA1024 negativa para a enzima	53
Figura 16 - Teste para produção das enzimas celobiase e esterase dos isolados leveduriformes obtidos de solo de Terra Preta Antropogênica. A) Cepas positivas para enzima celobiase e B) Cepas positivas para enzima esterase	54
Figura 17 - Percentagem absoluta do perfil enzimático dos isolados de leveduriformes de Terra Preta Antropogênica	54

Figura 18 - Teste para fenótipo *killer* em placas com suspensão de *C. albicans* com isolados de levedura obtidos de Terra Preta Antropogênica.....**55**

Figura 19 - Perfis de PCR-DGGE de Procariotos (A) e comunidades de eucariotos (B) em fragmentos de rDNA amplificados a partir de Terra Preta Antropogênica de um sítio arqueológico indígena do baixo Amazonas**61**

Figura 20 - Abundância de gêneros microbianos em solo de Terra Preta Antropogênica em um sítio arqueológico indígena do baixo Amazonas. (Números significam abundância das espécies)**62**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Características macromorfológicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.....	80
Tabela 2 - Características fenotípicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica	85
Tabela 3 - Perfil enzimático e teste para fenótipo <i>killer</i> de isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica	89
Tabela 4 - PCR-DGGE, primers utilizados para detectar comunidades de fungos e bactérias de solo de Terra Preta Antropogênica em um sítio arqueológico do baixo Amazonas	63
Tabela 5 - Diversidade Molecular de bactérias e fungos de solo de Terra Preta Antropogênica de um sítio arqueológico do baixo Amazonas	64
Quadro 1 - Resultados analíticos da amostra de solo de Terra Preta Antropogênica.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

1 N – Um Normal

ADE – Amazonian Dark Earth

AM – Amazonas

ATCC – American Type Culture Collection

C - Carbono

CLSI – Clinical Laboratory and Standards Institute

cm – centímetros

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRBC – Diclorana Rosa Bengala Cloranfenicol

EUA – Estados Unidos da América

f – Forward

Fig - Figura

GC – Guanina/Citosina

HCl – Ácido Clorídrico

ICET – Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia

ITS – (internal transcribed spacer) Espaçador Interno Transcrito

MIC – Concentração Inibitória Mínima

N – Nitrogênio

P – Fósforo

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDA – Ágar Batata Dextrose

pH – Potencial hidrogeniônico

r – Reverse

rDNA – Ácido Desoxiribonucleico ribossômico

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossômico

TPA – Terra Preta Antropogênica

TPI – Terra Preta de Índio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

YEPD – Yeast Extract Potato Dextrose

YEPG - Yeast Extract Potato Glucose

YM – Yeast Malt (meio de cultura)

YNB – Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
✓ Caracterizar a área de estudo do solo de TPA do sítio arqueológico da comunidade de Vila Amazônia, Parintins-AM;.....	21
3 DESENVOLVIMENTO	22
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1.1 Terra Preta Antropogênica.....	22
3.1.2 Diversidade microbiana em Terra Preta Antropogênica	27
3.1.3 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras	28
4 METODOLOGIA	33
4.1 LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA (TPA)	33
.....	33
4.2 AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS (<i>YEAST-LIKE</i>) DE SOLO DE TPA	34
4.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA PRELIMINAR DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS DE SOLO DE TPA.....	35
4.4 ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS FÚNGICAS	36
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	36
4.5.1 Tolerância ao etanol	36
4.5.2 Teste de tolerância à glicose 50%	36
4.5.3 Crescimento em diferentes temperaturas	37
4.6 AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DO PERFIL ENZIMÁTICO.....	37
4.7 PRODUÇÃO DE AMILASE	37
4.8 PRODUÇÃO DE CASEINASE	38
4.9 PRODUÇÃO DE GELATINASE	38
4.10 PRODUÇÃO DE CELOBIASE E ESTERASE	38
4.11 TESTE PARA DETECTAR LINHAGENS COM FENÓTIPO <i>KILLER</i>	39
4.12 PCR-DGGE DE LEVEDURAS E FUNGOS.....	39
4. 12. 1 Extração do DNA total de solo.....	39
4. 12. 2 Reação de amplificação.....	40

4. 12. 3 Preparo do gel e condições de corrida	41
4. 12. 4 Recorte, re-amplificação das bandas de DGGE	41
4. 12. 5 Purificação do produto de PCR	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	43
5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS LEVEDURIFORMES DE TPA	45
5.3 CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS OBTIDOS DE TPA	45
5.4 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE TPA.....	46
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ISOLADOS	49
5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS LEVEDURIFORMES DE TPA	50
5.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO EXTRACELULAR E TESTE PARA FENÓTIPO <i>KILLER</i>	50
5.8 PROPRIEDADES QUÍMICAS DO SOLO DE TPA.....	56
5.9 PCR-DGGE DAS AMOSTRAS DE SOLO DE TPA	59
.....	62
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
CRONOGRAMA	79
Apêndice A	81
Apêndice B	86
Apêndice C	90
Apêndice D	94
Apêndice D	96
Apêndice E	97

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia apresenta uma extensa gama de biomas que dão suporte a sua biodiversidade mundialmente conhecida. Dentre todos esses biomas o solo merece notável apreciação, pois, apresenta uma variedade de características físicas e químicas que influenciam na composição de sua macro e microfauna, estabelecendo assim, uma fonte muitas vezes ainda inexplorada de recursos.

Sabe-se que a maior parcela de solos amazônicos são ácidos e apresentam extrema pobreza de fósforo, alta saturação por alumínio e baixos índices de Capacidade de Trocas Catiônicas (CTC) (VALE JÚNIOR et al., 2011). Porém, existe uma unidade de solo de origem antrópica conhecida popularmente como *Terra Preta de Índio* (TPI) e mundialmente conhecida como *Amazonian Dark Earth* (ADE). Trata-se de um dos solos mais ricos do mundo. A Terra Preta Antropogênica (TPA) apresenta-se na forma de pequenas manchas distribuídas aleatoriamente, sobretudo na Amazônia Central e Oriental. Sua denominação, bem como suas características únicas, são decorrentes de ação antrópica exercida por civilizações indígenas que viveram nestes sítios arqueológicos. A grande quantidade de matéria orgânica estável presente nestes sítios arqueológicos é oriunda das lixeiras indígenas onde restos de animais, vegetais, dejetos fecais, corpos humanos, fragmentos cerâmicos, artefatos líticos e carvão pirogênico foram depositados. (LEHMANN et al., 2003).

Os solos de TPA são encontrados em áreas de terra firme sobre os mais diversos solos e na maioria das vezes seguindo cursos de rios e igarapés e ainda usufruem de visão topográfica privilegiada (GLASER et al., 2001). Sua intensa atividade física, química e biológica proporciona a sua constante fertilidade, sendo os microrganismos um dos componentes fundamentais para manutenção e persistência de tal característica neste solo. Os microrganismos são elementos fundamentais para o funcionamento sistemático dos ecossistemas, sendo indispensáveis nos processos de fragmentação e decomposição de matéria orgânica, promovendo assim, disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Há alguns anos, a taxa de conhecimento sobre a microbiota do solo e de outras amostras ambientais ainda era pouco evidenciada, pois, ainda se investigava essa diversidade através de métodos dependentes de cultivo (RANJARD et al.,

2000). Amann et al. (1995) comentam em sua pesquisa, que uma parcela ínfima de microrganismos são detectáveis por metodologias dependentes de cultivo, em números, isso representa em torno de 0,1% a no máximo 10% do total da população, deixando uma vasta taxa dessa microbiota desconhecida e não estudada. A ânsia de conhecer e compreender a diversidade microbiana não cultivável em solos e em outras amostras ambientais, em conjunto com a ascensão da biologia molecular estimulou e impulsionou o desenvolvimento de muitas técnicas independentes de cultivo, tendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), associada à Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) como uma das ferramentas mais utilizadas e poderosas para a investigação de variações ambientais e diversidade microbiana, bem como para a consolidação da metagenômica, que se refere a possibilidade de examinar uma maior diversidade microbiana de determinado ambiente com mais clareza e confiabilidade, utilizando por exemplo o pirosequenciamento (454 Life Science, Roche, EUA) que é referência entre as técnicas moleculares de análise da diversidade microbiana e de variações ambientais uma vez que possibilita a geração de um número muito maior de sequências do gene – alvo, pois aumenta a amostragem de sequência de DNA em várias ordens de grandeza, permitindo a detecção mais precisa dos membros menos abundantes e raros das comunidades microbianas (CAN SU et al., 2011).

Com a gama de microrganismos provavelmente presentes na TPA, existe uma exponencial probabilidade de serem isolados e identificados aqueles com alto interesse biotecnológico, pois, estes podem, por exemplo, ser produtores de enzimas, vitaminas, ou podem oferecer antibióticos de interesse industrial.

Todos esses fatores evidenciam que além de ser um solo fértil, a TPA pode oferecer também uma gama de recursos naturais e uma microbiota diversificada e muitas vezes inexplorada que pode ajudar na compreensão acerca da sustentabilidade desse solo, bem como, apresentar um potencial para produção de insumos biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Analisar a diversidade de procariotos e eucariotos e investigar entre os fungos isolados os que apresentam atividade enzimática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a área de estudo do solo de TPA do sítio arqueológico da comunidade de Vila Amazônia, região do Baixo Amazonas.
- ✓ Isolar fungos de solo de TPA;
- ✓ Caracterizar fenotipicamente os fungos isolados de solo de TPA;
- ✓ Investigar as propriedades químicas do solo de TPA;
- ✓ Caracterizar o potencial biotecnológico dos isolados em relação a tolerância ao etanol, tolerância a glicose, termotolerância, produção enzimática, fenótipo *killer*;
- ✓ Analisar a diversidade de eucariotos e procariotos através da técnica de PCR-DGGE;
- ✓ Identificar os fungos isolados por sequenciamento das regiões D1/D2 do 26S rDNA.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

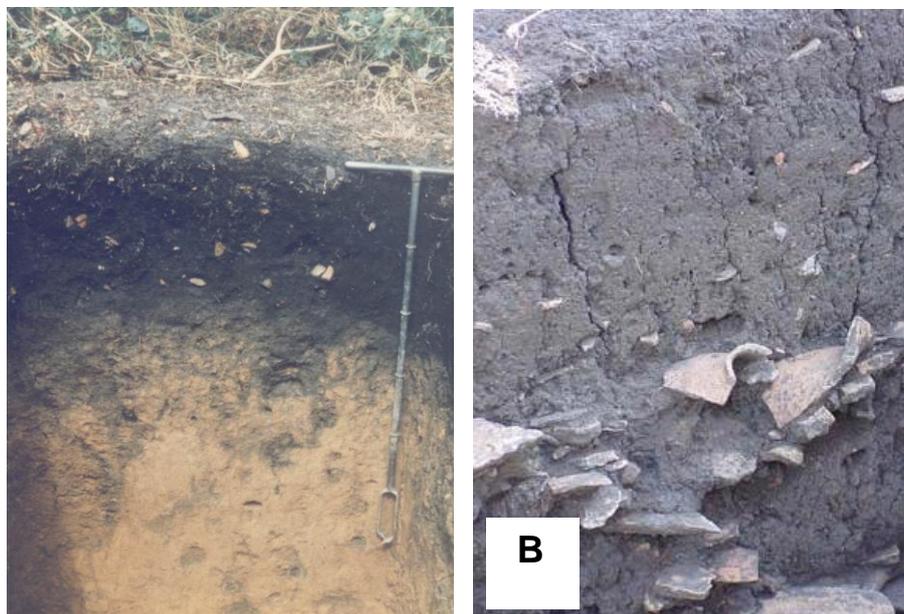
3.1. 1 Terra Preta Antropogênica

Na Amazônia, a diversidade de solos é um reflexo da combinação de fatores de formação como geologia, relevo, clima, bióticos e feições da paisagem. A região correspondente ao Estado do Amazonas é caracterizada como uma região sedimentar, logo, formada por sedimentos terciários a holocênicos, associados ao Latossolo Amarelo distrófico e distrocoeso, Argissolo Amarelo distrófico e Plintossolos (VALE JÚNIOR et al., 2011). Esses solos são considerados solos de baixa fertilidade, pH ácido e baixa capacidade de realizar trocas catiônicas. Porém, em posição adjacente a esses solos, pode ser encontrado um dos solos mais férteis do mundo, identificados popularmente como Terra Preta de Índio (TPI) ou cientificamente conhecidos por Terra Preta Antropogênica (TPA), representando uma parcela mínima dos solos Amazônicos, provavelmente cobrindo algo em torno de 0,1 a 0,3 % da área florestada da Amazônia (SOMBROEK et al., 2003).

Esses solos são encontrados em sítios arqueológicos onde viveram civilizações indígenas antigas, fato que justifica a terminologia Terra Preta Antropogênica (TPA). Caracterizada por apresentar altos teores de nutrientes como cálcio, magnésio, fósforo e potássio, e alguns micronutrientes como manganês e zinco e altos índices de trocas catiônicas (SOMBROEK, 1966; KERN; KAMPF, 1989; LEHMANN et al., 2002). Esses solos apresentam o pH em torno de 5 a 7, e elevados teores de matéria orgânica e intensa atividade biológica quando comparados a solos adjacentes (LIMA et al., 2002).

Solos de TPAs apresentam coloração escura, formação de horizontes do solo bem definidos, altos índices de substâncias húmicas e notável distribuição de fragmentos cerâmicos e artefatos indígenas incorporados a sua matriz superficial (Figura1), além do carvão pirogênico que também está intimamente ligado a microbiota bem como a fertilidade e sustentabilidade desse solo (LEHMANN et al., 2004).

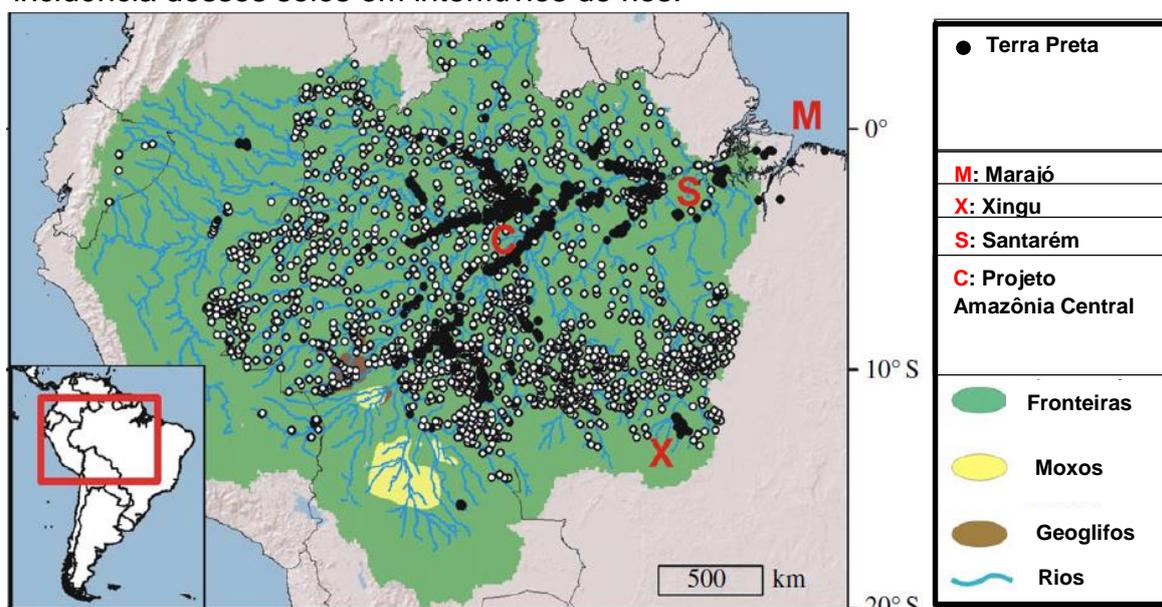
Figura 1 – **A)** Perfil de solo de Terra Preta Antropogênica, destacando a coloração escura na camada superficial; **B)** Mostra os fragmentos cerâmicos e artefatos indígenas em Terra Preta Antropogênica.



Fonte: Glaser et al. (2001)

As áreas de TPAs são encontradas sobre os mais diversos tipos de solos, localizando-se em áreas de terra firmes, ocupando regiões com visão topográfica privilegiada e normalmente acompanhando cursos de rios e igarapés, este último representado no mapa de TPAs (Figura 2).

Figura 2 – Mapa de Terras Pretas Antropogênicas no Brasil destacando a incidência desses solos em interflúvios de rios.



Fonte: McMichael et al. (2014)

Esses solos ocupam normalmente pequenas áreas, em torno de 0,5 a 3 hectares (ha) havendo, entretanto, indicações de sítios na Floresta Nacional de Caxiuanã no Estado do Pará (PA) que se estendem por mais de 100 ha. Apesar da existência de muitos sítios arqueológicos já identificados, não se tem um mapeamento completo de todas as ocorrências de TPA na Amazônia como é o caso do sítio Parintins investigado neste estudo. Quanto à espessura, esses solos normalmente atingem de 30 a 80 cm, podendo em alguns casos atingir até 2 m de profundidade (SMITH, 1980). Segundo McMichael et al. (2014), essas variações de profundidades estão relacionadas aos padrões de assentamento do homem pré-histórico, devido à intensidade, duração e natureza das atividades exercidas que formaram estes solos, bem como processos de origem natural e atividades decorrentes após o abandono desses sítios.

Normalmente, populações locais utilizam a longevidade da fertilidade encontrada em áreas de TPAs para o cultivo de subsistência, tais como, mandioca, banana, milho, mamão, entre outros cultivares característicos da agricultura familiar regional.

A TPA foi descrita pela primeira vez por Hartt (1885) quando este realizava pesquisa aos arredores de Tapeirinha – Pará, o qual descreveu as terras pretas apenas como solos que consistiam em uma rica e fofo terra vegetal de cor preta.

Desde a década de 60 os estudos realizados com terra preta se delimitavam em domínio de arqueólogos, etnobotânicos ou cientistas do solo que trabalhavam em pesquisas individuais. Apenas a partir de 1980 a pesquisa com TPA ramificou-se para outros campos da ciência, ganhando assim, multidisciplinariedade (ERICKSON, 2003).

Apesar de não ter sido o primeiro descritor, Wim Sombroek (Figura 3) é considerado o pai dos estudos em TPA, pois introduziu em 1966 em sua dissertação, os primeiros estudos químicos e de fertilidade em solos de TPA (LEHMANN et al., 2002).

Figura 3 - Wim Sombroek (1934-2003)

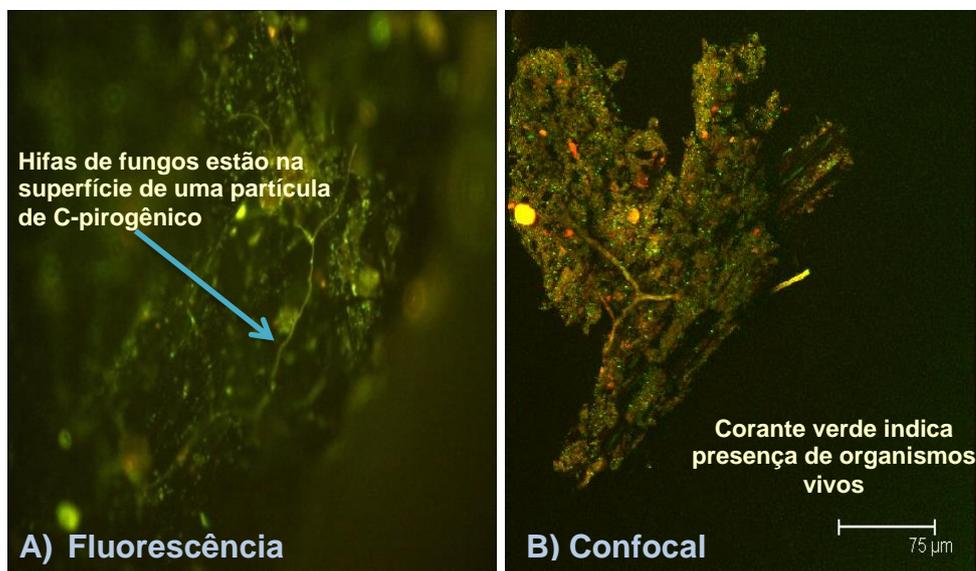


Fonte: Lehmann et al. (2002)

Uma questão que apenas recentemente foi esclarecida é quanto à formação do solo de TPA, pois, uma das hipóteses lançadas seria a de que este era formado por eventos geológicos, cinzas vulcânicas, decomposição de rochas vulcânicas ou a partir de sedimentos depositados no fundo de lagos extintos (FALESI, 1972). No entanto, dados recentes apontam que as TPAs teriam origem antrópica, provenientes de antigos assentamentos indígenas, que contribuíram para o enriquecimento desses solos através da prática do manejo de material orgânico e do fogo ao longo de centenas de anos (SILVA, 2011).

De acordo com Grossman et al. (2010) outro fator que contribui de forma indispensável para que ocorra a persistência na sustentabilidade desses solos, é a presença de uma microbiota associada ao solo e a partículas de carvão pirogênico, comprovando a alta atividade biológica no solo de TPA e mostrando que o carvão serve como plataforma para a troca de nutrientes com os microrganismos (Figura 4).

Figura 4 – **A)** Imagens por microscopia fluorescente e **B)** confocal, demonstram presença de microrganismos em superfícies de carvão pirogênico de Terra Preta Antropogênica.



Fonte: Grossman et al. (2010)

Quanto a sua microbiota, a TPA vem sendo bastante investigada, no entanto ainda ficam lacunas principalmente devido à presença de sítios ainda não estudados e que podem fornecer dados ainda desconhecidos sobre a microbiota associada a este solo (TSAI et al., 2009).

A fertilidade sustentável desses solos é algo que vem sendo bastante estudado, pois, busca-se imitar solos de TPAs para a transformação de solos adjacentes visando o aprimoramento de técnica sustentável na agricultura. No entanto é necessário compreender todos os fatores associados a este solo. De acordo com Navarrete (2010) um fator importante é quanto à microbiota presente nesse solo, e nesse contexto, ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos para compreender a dinâmica microbiana em função do desenvolvimento sustentável desse solo, este afirma ainda que a presença de matéria orgânica estável e grande atividade biológica indicam que a TPA pode oferecer um elevado e robusto consórcio microbiano.

Segundo Tsai et al. (2009), a estabilidade de matéria orgânica associada a grande atividade biológica reforçam que sítios de TPA proporcionam alta taxa de diversidade microbiana, constituindo assim, uma fonte de microrganismos conhecidos e também aqueles que nunca foram identificados, além de

provavelmente poder oferecer cepas selvagens com elevado potencial biotecnológico. Atualmente, busca-se compreender a microbiota de sítios de TPA, principalmente de sítios que nunca foram estudados, assim, tentar detalhar com mais clareza a dinâmica ocorrente neste solo e especificar os mistérios envolvidos na fertilidade e sustentabilidade desse solo considerado o “Ouro Negro da Amazônia”.

3.1.2 Diversidade microbiana em Terra Preta Antropogênica

A comunidade microbiana no solo é fundamental para que ocorra o funcionamento sustentável deste bioma, sendo participantes fundamentais no processo de fragmentação e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Microrganismos podem exercer o papel de bioindicadores da qualidade do solo, devido à sua rápida resposta as alterações ambientais. Porém, a sustentabilidade do ecossistema pode ser afetada caso ocorram mudanças na distribuição das comunidades microbianas (PAZINATO, 2007).

A adaptabilidade genética e diversidade metabólica são fatores que propiciam as atividades dos microrganismos no solo (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004).

Atribui-se a falta de conhecimento sobre a diversidade de microrganismos do solo de TPA e outras amostras ambientais aos métodos dependentes de cultivo (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Estudos afirmam que em uma única grama de solo pode se obter aproximadamente 2.000 a 8 milhões de bactérias, desse total apenas uma pequena fração pode ser cultivada por técnicas tradicionais de microbiologia clássica, deixando uma vasta porção dessa microbiota desconhecida e não estudada (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006).

Segundo Borneman et al. (1996), os microrganismos desempenham funções essenciais para a manutenção do solo, pois estabelecem participação no ciclo de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), dentre outros e atuam na remoção de toxinas, logo, torna-se imprescindível a manutenção da diversidade microbiana para garantir a qualidade do solo.

A ascensão da biologia molecular como ferramenta metodológica forneceu suporte para o entendimento da relação da fertilidade do solo e a dinâmica das

comunidades microbianas, além de proporcionarem uma alta taxa de microrganismos identificados (CANNAVAN, 2011).

Tsai et al. (2009) avaliaram a diversidade bacteriana em TPA de um sítio arqueológico na Amazônia Ocidental. Neste trabalho foram utilizadas técnicas moleculares com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, onde os autores da pesquisa demonstraram elevada diversidade bacteriana e alta ocorrência de clones homólogos de bactérias não cultivadas. Isto mostra que existe a necessidade de se estudar esses sítios de TPAs, pois, podem ser “*pontos quentes*” de diversidade microbiana ainda pouco conhecida.

Em outro estudo, O’Neill et al.(2009) avaliaram comunidades bacterianas em TPA e solo adjacente, através de técnicas dependentes de cultivo e técnicas moleculares. Os autores observaram que havia maior população e diversidade bacteriana em amostras de TPA quando comparados ao solo adjacente.

Recentemente, Grossman et al. (2010) aplicaram em seu estudo sobre as comunidades dos domínios *Bacteria* e *Archaea* em TPA a técnica de *Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante*, DGGE e *Análise do Polimorfismo do Fragmento de Restrição Terminal*, T-RFLP. Essas duas técnicas são utilizadas com frequência para estudos da diversidade microbiana de solos de TPA e outras amostras ambientais. A técnica de DGGE tem proporcionado resultados bastante satisfatórios, pois tem se mostrado eficaz para detectar variações na comunidade microbiana que refletem tanto na população cultivável como também nas populações dominantes não cultiváveis presentes nas amostras ambientais (CANNAVAN, 2011).

A maioria dos estudos sobre taxonomia molecular da microbiota em TPA estão restritos aos estudos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* em sítios alterados por ação humana contemporânea e não em sítios nativos e selvagens como é o caso do sítio arqueológico investigado neste estudo. Ainda, tem-se a necessidade de compreender as comunidades de eucariotos e verificar também através de técnicas dependentes de cultivo, o potencial biotecnológico que esses isolados podem oferecer e conseqüentemente sequenciá-los e identificá-los.

3.1.3 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras

Leveduras são microrganismos pertencentes ao reino *fungi*, possuem características semelhantes aos fungos como presença de uma rígida parede

celular, organização nuclear através de membrana nuclear (célula eucariótica), aclorofilados, absorvem nutrientes através de heterotrofismo, reproduzem-se de forma sexuada e/ou assexuada através de células especializadas conhecidas como esporos e não apresentam motilidade (SCHWAN, 2007). Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo que é predominante unicelular, sua reprodução ocorre através de brotamento ou fissão e por formarem corpos de frutificação, este último é compreendido como a característica mais significativa quando se diferencia leveduras dos demais fungos (KURTZMAN; FELL, 1998). Este grupo está correlacionado a processos fermentativos de diversos tipos de açúcares, produção de vitaminas, enzimas, e fatores extracelulares micocinogênicos (PALUAN, 2011).

Normalmente leveduras podem ser encontradas em frutos, folhas, matéria em decomposição e outros substratos contendo açúcares, no entanto esses microrganismos também podem ser isolados do ar, águas, rios, mares e principalmente no solo (TAKASHIMA; NAKASE, 2001).

Estudos focados na capacidade enzimática de leveduras do ambiente são pouco frequentes, mas têm demonstrado que leveduras isoladas de ambientes amazônicos, principalmente de solos, representam uma fonte abrangente de enzimas com potencial para uso industrial, pois caracteriza um ambiente de intensa competição por nutrientes e estresse causado pela alta taxa de população microbiana (PALUAN, 2011).

Pensando nesse propósito, o solo de TPA pode ser um excelente substrato para isolamento e identificação de leveduras que apresentem potencial biotecnológico, pois, estas podem, por exemplo, ser produtoras de enzimas, vitaminas, ou podem oferecer antibióticos de interesse industrial. Particularmente, este sítio de TPA de Parintins-AM, por ainda ser isento de estudos, caracteriza uma mínima perturbação ecológica, podendo oferecer cepas selvagens de importância biotecnológica.

3.1.4 Leveduras no ambiente e no solo

Estima-se que apenas 1% das espécies existentes de leveduras foram classificadas e identificadas (FELL et al., 2000). Com o advento de metodologias moleculares rápidas e precisas, como o sequenciamento de regiões consideradas

marcadores filogenéticos do genoma, este número vem crescendo vertiginosamente, permitindo a identificação de novas leveduras e estimando-se um número de 1000 espécies para 2016 (LACHANCE, 2006).

Aplicações biotecnológicas das leveduras são amplamente estudadas, especialmente, nos processos fermentativos para produção de pães e bebidas provenientes de diversas origens vegetais, álcool combustível e outros produtos oriundos deste processo. Outras funcionalidades como a dos carotenoides importantes constituintes na indústria alimentícia, devido as suas propriedades na produção de: corantes, compostos anticarcinogênicos, antioxidantes e pró-vitamina A, foram relatados pelos gêneros: *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces* (MALDONADE, 2008).

Leveduras do gênero *Candida* apresentaram diversas espécies, algumas comercialmente viáveis, capazes de produzirem lípases e degradarem lipídios (WACHÉ et al., 2006). Em processos destinados a biorremediação, leveduras dos gêneros *Candida*, *Debarymyces* e *Rhodotorula*, foram isoladas de ambientes contaminados com bifenil e demonstraram a funcionalidades em degradá-los (ROMERO et al., 2006).

O fenol, outro composto tóxico proveniente de resíduos industriais, também pode ser degradado pela espécie *Candida tropicalis*, isolada de solos Amazônicos (BASTOS et al., 2000). Na agricultura, atividades destinadas ao controle biológico de patógenos, especialmente de frutos na pós-colheita, são amplamente estudadas sendo, cada vez maior o número de espécies relacionadas (JANISIEWICZ; KURTMAN; BUYER, 2010). Muitas leveduras foram isoladas de processos de bebidas e alimentos (SILVA-FILHO et al., 2006), sendo inclusive encontradas em carnes embutidas.

Para maiores informações, Silva - Filho (2007) aborda em sua revisão, trabalhos relacionados á ecologia e biologia das leveduras nos processos industriais alimentícios e de bebidas. Contudo, a localização das leveduras é extremamente diversificada, sendo encontrada em associações com animais (SATO; MAKIMURA, 2008), insetos (RODRIGUES et al., 2009) e até em ambientes extremos (VADKERTIOVÁ; SLAVIKOVÁ, 2006). Esta vasta ocorrência em diversos ambientes naturais é devido á sua seletividade nutricional, características de cada espécie, que

permite amplas especializações ecológicas e nichos distintos (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

No solo, inúmeras espécies são habitantes típicas, exercendo uma contribuição significativa para a biodiversidade, com funcionalidades específicas neste habitat, sendo sua capacidade de sobrevivência variável, podendo existir de nenhuma a milhares de leveduras por grama de solo (PHAFT; STARMER, 1987). Dentre os principais atributos para a manutenção da comunidade de leveduras no solo, estão: a) sua capacidade de multiplicação; b) suprimento regular de frutas, restos vegetais e animais em decomposição, c) interações com plantas e insetos e d) balanço entre as taxas de crescimento e morte das células (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008). Alguns gêneros como: *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Schwanniomyces* e *Schizoblastosporium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon* e *Sporobolomyces* são as leveduras mais encontradas no ambiente de solo (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

A presença de leveduras em solos é extremamente diversificada estando: em florestas (ROMERO et al., 2006), campos agrícolas (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003), praias (VOGEL et al., 2007) e até mesmo, em solos da Antártica (VISHNIAC, 1996).

Em solos florestais Slaviková e Vadkertiová (2000) isolaram 181 linhagens de leveduras de 180 amostras de solos coletadas em uma floresta de coníferas e duas florestas decíduas. Dentre as espécies mais isoladas foram encontradas: *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula aurantiaca* e *Trichosporon cutaneum* representando 89% do total de contagens de leveduras encontradas nas amostras de solo. Além disso, os resultados indicaram que algumas das espécies de leveduras isoladas possuíam habilidade para degradação de alguns compostos fenólicos e clorofenólicos e a maioria foi capaz de consumir uma ampla variedade de carboidratos, especialmente, os relacionados á degradação de derivados da hemicelulose, como celobiose, xilose e L- arabinose, açúcares com cinco carbonos.

Vital e colaboradores (2002) estudaram a ocorrência de leveduras com atividades micocinogênicas no solo da Amazônia. Um total de 240 linhagens de leveduras foram isoladas, de amostras de solo da Estação Ecológica de Maracá, estado de Roraima, Amazônia, Brasil e identificadas por análises moleculares de sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA. Dentre as espécies isoladas as

mais comuns foram *Candida robusta*, *Candida rugosa*, *Candida valida*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa*. De todos os isolados apenas seis linhagens, pertencentes às espécies *Williopsis saturnus* e *Issatchenkia* sp., foram capazes de produzir micotoxinas, o estudo demonstrou que leveduras micocinogênicas possuem uma ampla distribuição geográfica em diversos micro habitats, embora componham porções de comunidades de leveduras relativamente pequenas.

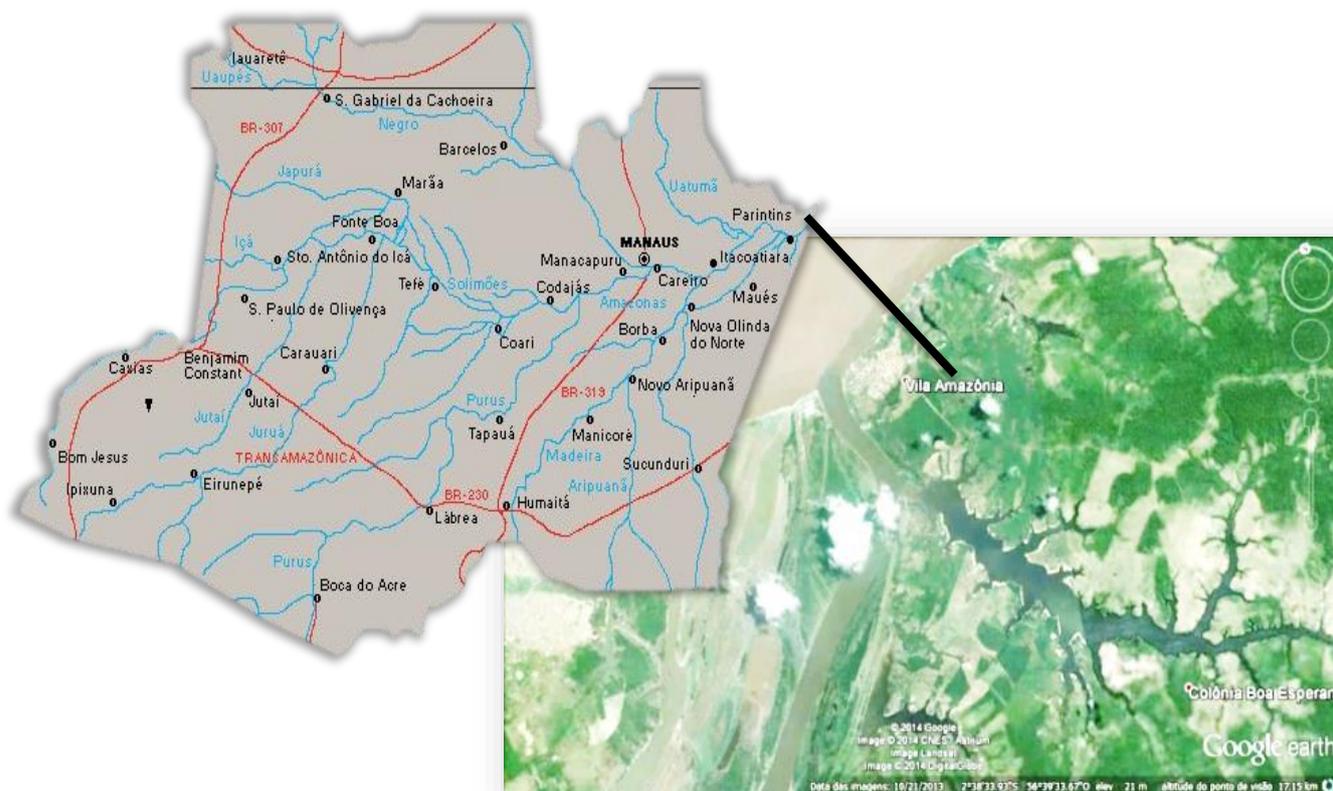
Slaviková e Vadkertiová (2003) isolaram 111 leveduras (8 gêneros e 11 espécies) de solos agrícolas cultivados com batata, beterraba, milho e grãos, do sudoeste da Eslováquia. As leveduras mais frequentemente encontradas foram: *Cryptococcus laurentii*, *Cândida maltosa*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Psorobolomyces salmonicolor*, representando 78 de 86% das contagens totais de leveduras nas amostras do solo.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA (TPA)

As amostras foram coletadas na comunidade de Vila Amazônia, que fica localizada na região do baixo Amazonas próxima a sede do município de Parintins-AM, com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: S 02° 29'25.41' e Longitude: W 056° 29'10.33'

Figura 5 – Localização do sítio arqueológico de Terra Preta Antropogênica de Parintins-AM

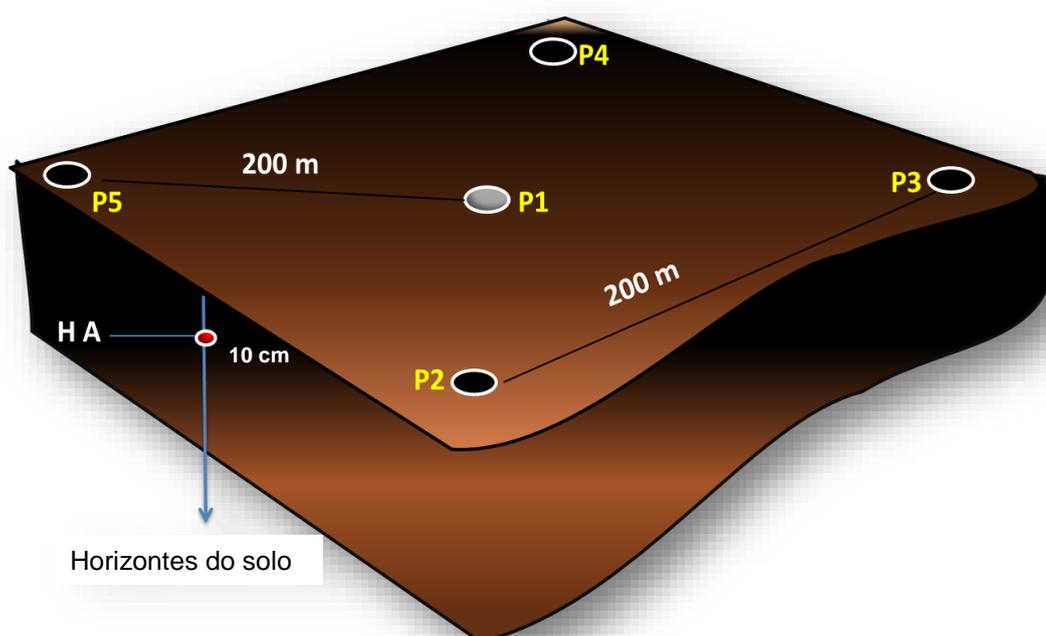


Fonte: Googleearth/maps/images; editado por: Wenderson Cid. 2015

4.2 AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS (*YEAST-LIKE*) DE SOLO DE TPA

Para a coleta das amostras foi delimitada uma área com lados de mesmas dimensões (200 m de lado) e nesta área foram coletadas cinco amostras, uma em posição central e outras quatro nas regiões adjacentes correspondentes aos cantos da área proposta. Em todos os pontos foram feitas triplicatas do solo coletado. Uma representatividade absoluta ao triar amostras de solo para o isolamento de microrganismos em cultura não é possível de ser obtida, sendo assim, a amostragem obedeceu a critérios no sentido de conseguir melhor representatividade das amostras (FORSTER, 1995).

Figura 6 - Esquema gráfico de coleta de amostras de solo de TPA considerando o horizonte A antrópico (HA)



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

As amostras de solo de TPA foram coletadas a 10 cm da camada superficial, com auxílio de espátulas desinfetadas com álcool 70° GL em sacos plásticos autoclaváveis limpos e estéreis. Para a realização deste processo, primeiramente foram removidos detritos lenhosos grosseiros, raízes, folhas e pedras da camada correspondente à película superficial do solo (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). As

amostras obtidas foram armazenadas a 4°C (YURKOV; KEMLER; BEGEROW, 2011) e transportadas ao laboratório de micologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) onde foram mantidas a -20°C para posterior análise.

As amostras de solo de TPA foram diluídas (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina 0,9% e agitadas em agitador (*vortex*) durante 1 minuto e, antes da retirada de cada inóculo, as mesmas foram brevemente reagitadas. Inóculos de 0,1 mL destas diluições foram semeados em placas de Petri (10 cm de diâmetro) e espalhados em superfície (*spread plate*), utilizando alça de Drigalsky. As placas contiveram meio Diclorana Rosa Bengala Cloranfenicol Ágar (DRBC), pois o diclorana e o rosa bengala diminuem efetivamente o crescimento de fungos de desenvolvimento rápido e proporcionam a detecção de outros propágulos de fungos e leveduras que possuem menor taxa de crescimento (GAVA, 2002).

Alternativamente, visando isolar a microbiota com maior eficiência, alíquotas de 10g de solo foram inoculadas em 50 ml de caldo extrato de levedura-malte (YM) (0,3 % extrato de levedura, 0,3 % extrato de malte, 0,5 % de peptona, 1 % de glucose, ajustado a pH 4,0-4,5 antes da autoclavagem com HCl 1 M. Suplementado com 200 mg/L de cloranfenicol) em frasco de 250ml e incubadas a 25°C por 3 dias em agitador orbital e, posteriormente, inóculos de 0,1 mL deste caldo foram semeados em placas de Petri (10 cm de diâmetro) e espalhados em superfície (*spread plate*) em ágar YM.

Tanto as placas com meio DRBC, quanto as com meio YM, foram incubadas a temperatura ambiente, sendo o crescimento das colônias acompanhado por até 3 dias (YURKOV; KEMLER; BEGEROW, 2011).

4.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA PRELIMINAR DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS DE SOLO DE TPA

As cepas de leveduras foram caracterizadas em termos morfológicos seguindo métodos padronizados (YARROW, 1998; BARNETT et al., 2000). Quanto à morfologia colonial, foram observadas as características coloniais como cor, brilho, forma, superfície e consistência. Quanto à morfologia celular, foram feitas lâminas à fresco a partir do crescimento de culturas em ágar YM com no máximo uma semana

de incubação a 25°C e a observação foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000x.

As características celulares observadas foram: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, caso seja por brotamento, o tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascósporos e de balistosporos, segundo Kurtzman; Fell, (1998) e Barnett et al. (2000). Foi verificada a produção de ascósporos pelas leveduras com afinidade ascomicética, utilizando o meio indutor ágar acetato (0,4% acetato de sódio anidro, 2% ágar) e incubação a 25°C por até um mês. Em microscopia óptica, foram observadas a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação (LANDELL, 2006).

4.4 ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS FÚNGICAS

Para a manutenção dos isolados obtidos foi utilizado o meio YEPD (extrato de levedura-peptona-dextrose). Os isolados puros foram semeados em tubos de ensaio contendo o meio sólido inclinado, conservados em geladeira a 4-8°C e repicados bimestralmente. Ainda, os isolados foram preservados em caldo YEPD com glicerol 50% a -20°C.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

4.5.1 Tolerância ao etanol

Os isolados foram examinados para sua tolerância a alto conteúdo de etanol cultivando-os em placas de ágar YEPD contendo 15 a 30% de etanol. As cepas que conseguirem crescer em placas com etanol foram ainda testadas por cultura em caldo YEPD contendo 5-15% de etanol sob agitação e comparadas em termos de crescimento a uma OD600nm em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

4.5.2 Teste de tolerância à glicose 50%

Para tal, foi utilizado o caldo YEPD modificado (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 50% de glicose). Como controle positivo foi utilizado o

meio com glicose 2%, incubação a 25°C por 21 dias, sendo a leitura realizada de sete em sete dias pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (BARNETT et al., 2000).

4.5.3 Crescimento em diferentes temperaturas

Foi realizado crescimento em diferentes temperaturas entre 24°C e 60°C em caldo YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% de glicose), sendo a densidade óptica monitorada a 600nm em espectrofotômetro (LEE et al., 2011).

4.6 AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DO PERFIL ENZIMÁTICO

Os isolados foram previamente cultivados em Ágar YEPG por 24h para verificação da pureza das culturas e obtenção de células metabolicamente ativas. Placas ou tubos de ensaio contendo os substratos enzimáticos correspondentes foram avaliados semiquantitativamente para a presença ou ausência de atividade enzimática e seus resultados classificados como negativo (-), fraco (W), positivo (+), ou forte atividade (++) , de acordo com o halo de atividade enzimática em meio. No meio sólido, as escalas em centímetros dos diâmetros de difusão das enzimas foram classificadas como: fraca atividade (W), quando menor ou igual a 1,5cm, atividade positiva (+), entre 1,5 a 3cm, e forte atividade (++) , acima de 3cm para o teste de amilase e as demais enzimas classificadas como fraca atividade, quando menor ou igual a 0,5cm, atividade positiva quando maior que 0,5cm, e forte atividade quando maior ou igual a 1cm com a finalidade de selecionar as cepas melhores produtoras das respectivas enzimas. Estes limites foram determinados empiricamente com cepas produtoras por Landell (2006).

4.7 PRODUÇÃO DE AMILASE

Foi verificada através da degradação do amido solúvel (STRAUSS et al., 2001). Após 7 dias de incubação foi adicionada uma solução de lugol a placa de ágar amido, observando-se após 30 minutos, um halo nítido amarelado ao redor do crescimento das cepas consideradas positivas (MACFADDIN; LIPPINCOTT, 2000).

4.8 PRODUÇÃO DE CASEINASE

A atividade caseinolítica foi testada em placas de Petri contendo ágar caseína, pH 7,0 ajustado com KOH 5N (STRAUSS et al., 2001). A revelação foi realizada após 7 dias de incubação a 25°C, com adição de HCl 1N na superfície do meio deixando reagir com a caseína por 1h. O resultado é positivo quando ao redor do inóculo surge um halo transparente devido à hidrólise da caseína, circundado por um fundo com coloração esbranquiçada.

4.9 PRODUÇÃO DE GELATINASE

A atividade de protease foi verificada através da hidrólise de gelatina, utilizando o meio malte-gelatina (10% extrato de malte, 12% gelatina) em tubos de ensaio (TRINDADE et al., 2002). As leveduras, depois de crescidas em ágar YEPG por 48h a 25°C, foram inoculadas na superfície do meio (em tubos) e incubadas por 21 dias a 25°C. Após esse período, deixaram-se os tubos cerca de 2h a 4°C e, em seguida, é avaliada a atividade enzimática através do grau de hidrólise do meio. Consideram-se produtores de gelatinase aqueles isolados que liquefazem parcial ou completamente o meio de cultura após a retirada dos tubos da refrigeração.

4.10 PRODUÇÃO DE CELOBIASE E ESTERASE

A capacidade de degradar celobiose e a atividade de esterase foi verificada pelo método réplica em placas. As cepas foram previamente inoculadas em água destilada por 24 h para exaurir as reservas energéticas endógenas. Então, foram inoculadas nos respectivos meios (0,67% YNB, 2% ágar e 0,5% celobiose ou Tween 20 0,5%), conforme Yarrow (1998). Após 7 dias de incubação a 25°C, a atividade enzimática foi mensurada através da intensidade do crescimento colonial em comparação ao crescimento das mesmas cepas no controle negativo (sem celobiose ou Tween 20) e no controle positivo (com glicose). O crescimento em meio contendo o substrato enzimático como única fonte de carbono foi considerada evidência de que a levedura produz a respectiva enzima (MAUTONE, 2008).

4.11 TESTE PARA DETECTAR LINHAGENS COM FENÓTIPO *KILLER*

A atividade micocinogênica (*killer*) foi testada de acordo com Abranches et al. (1997) e Fuentefria (2007). As leveduras isoladas foram testadas contra fungos patogênicos das espécies *Candida albicans* e *Candida krusei*. A atividade *killer* foi testada em meio YM contendo 0.003% de azul de metileno, pH 4,2. A cepa patogênica foi diluída em água destilada estéril e semeada sobre a superfície do meio com auxílio de um suabe. As leveduras isoladas foram inoculadas com alça de platina na superfície do meio contendo a cepa sensível previamente inoculada. As placas foram incubadas a 25°C, por sete dias. As cepas foram consideradas como possuidoras de atividade *killer* quando houve um halo de inibição do crescimento dos fungos patogênicos ao redor do crescimento das leveduras isoladas.

4.12 PCR-DGGE DE LEVEDURAS E FUNGOS

4. 12. 1 Extração do DNA total de solo

De cada um dos 5 pontos coletados (figura 6), amostras foram selecionadas ao acaso e seu DNA total do solo extraídos utilizando-se o *Kit Power Soil DNA* (MoBio, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante e resumidas abaixo.

Uma amostra de 0,25 g de solo (peso úmido) foi pesada em uma balança analítica, adicionada ao tubo Power Bead de 2 ml, agitada levemente, acrescido 60 ul da solução C1 invertendo o tubo várias vezes agitado em um vortex na velocidade máxima por 10 min e centrifugado a 10.000 g por 30 s. O sobrenadante obtido (aprox. 450 ul) foi transferido para um novo tubo, adicionado 250 ul da solução C 2, agitados por 5 s. e incubado a 4°C por 5 min. Após este período, centrifugou-se a 10.000g por 1 min e então 600 ul do sobrenadante foi transferido para um novo tubo; adicionou-se 200 ul da solução C 3 e agitou-se por 5 s, após essa etapa, incubou-se novamente a 4°C por 5 min. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 g por 1 min e transferiu-se 750 ul do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 ul da solução C 4, agitou-se por 5 s, carregou-se 675 ul da solução no tubo contendo a coluna e então centrifugou-se por 1 min a 10.000 x g. A solução coletada no tubo foi

novamente descartada, o restante foi aplicado na coluna, centrifugado por 1 min a 10.000 g. A solução coletada no tubo foi novamente descartada, o restante foi aplicado na coluna, centrifugado novamente nas condições anteriores. Após isto, adicionou-se 500 µl da solução C 5 na coluna centrifugou-se a 10.000 g por 30 s; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 min a 10.000 g; após essa etapa, a coluna foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 100 µl da solução C 6 no centro da coluna; centrifugou-se por 30 s a 10.000 g e obteve-se o DNA extraído das amostras.

Para a quantificação da extração, para uma alíquota de 5 µl do DNA extraído foi submetido á eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) (4µl/100 ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O Gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e então foi documentada.

4. 12. 2 Reação de amplificação

Para as reações de DGE, foram adotadas metodologias semelhantes ás propostas por outros autores que amplificaram DNA de leveduras a partir de amostras fermentativas e ambientais (MESQUITA et al., 2013). A amplificadora ocorreu em duas etapas sendo a primeira efetuada com os primers ITS1 f GC (5' – TCC GTA GAA CCT GCG G -3') e ITS4 r - (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') com as seguintes condições: 3 µl do DNA total extraído do solo, 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 pmol/µl de cada primer, 0,05 U/µl de Platinum® *Taq Polimerase* 5 U (Invitrogen, Brasil) e água ultra pura (Mili-Q) para complementar o volume da reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 5 min; 30 ciclos de 92°C por 60 s, 55°C por 60s e 72°C por 1 min; seguido de uma extensão final a 72°C por 1 min. Uma segunda reação foi efetuada, utilizando os primers, 968f-GC (5' – AAC GCG AAC CTT AC-3') e 1401r (5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC - 3'), propostos por Mesquita et al. (2013), nas seguintes condições: 1 µL do produto de PCR anterior diluído 50x, 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 nM de cada dNTP, 0,20 pmol/µl de cada primer 0,05 U/µL de Platinum® *Taq Polimerase* 5 U (Invitrogen, Brasil) a água ultra pura (Mili-Q) para complementar o volume da

reação. As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador, modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), com as condições semelhantes a primeira, exceto o número de ciclos que aumentou para 35. A confirmação dos produtos de amplificação, de ambas as reações, foram analisados em géis de agarose 1,3% (p/v) em tampão TSB, utilizando como padrões moleculares: 2 uL de Low mas DNA Ladder (Invitrogen, Brasil). O gel foi submetido a um campo elétrico de 70 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

4. 12. 3 Preparo do gel e condições de corrida

As análises de DGGE foram efetuadas com o aparelho phoruU2 (ingeny, Leiden, The Netherlands,) em um gel de poliacrilamida 8%, com um gradiente de desnaturação de 32-45% e um campo elétrico de 70V por 16 h. Para o preparo do gel os respectivos gradientes de 35% (low) e 70% (High) foram realizados misturando-se as soluções A- (Acrilamida 8%) e B (Acrilamida 8%, Uréia 5,6M e Formamida deionizada 32%) e adicionando 75 uL de APS 20% e 12 uL TEMED, em cada uma das soluções. Em seguida, as soluções foram misturadas em uma bomba misturadora; e, após 50 min., o Stacking foi confeccionado com: 7 ml de poliacrilamida da solução A, 45 uL de APS 20% e 10uL de TEMED, sendo aguardado 60 min., para a polimerização do mesmo. Aproximadamente, 3 uL do produto de PCR, juntamente com 2 uL de Tampão de carregamento foram aplicados no gel e então este submetido as condições de voltagem e tempo acima citadas.

Os géis foram corados com Nitrato de Prata 0,15%, no qual estes foram mantidos em uma Solução Fixadora (Etanol 10% e Ácido Acético 0,5%) por 15 min., seguidos de uma coloração em solução de Nitrato de Prata 0,15% agitado gentilmente por 15 min. revelados em uma solução Reveladora (400 uL de Formaldeído e 100 mL NaOH 1,5%) até a intensidade desejada. Para interromper o processo de revelação foi utilizado uma solução de Parada (NaCO_3 0,75%) por 10 min., e o gel foto documentado em um Scanner HP 4050 (HP Hewlett Packard), sendo a imagem salva no formato jpeg.

4. 12. 4 Recorte, re-amplificação das bandas de DGGE

As bandas incisadas do gel foram eluídas em 20 uL de água ultrapura (Mili-Q) e 1 uL deste DNA difundido utilizado para reação de PCR com as condições anteriormente citadas. Para confirmação, o produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1,3% (p/v) em tampão TSB, utilizando como padrões moleculares: 2 uL de Low mass DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) e 5 uL de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil). O gel foi submetido a um campo elétrico de 70 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

4. 12. 5 Purificação do produto de PCR

Objetivando produtos de PCR com um maior grau de pureza as amostras de bandas re-amplificadas foram purificadas com o Kit GFX™ *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com instruções do fabricante e resumidos em seguida. Ao produto de PCR, foram adicionado 100 ul de *Capture buffer type* e esta transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000g por 30s e o filtrado descartado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Inicialmente torna-se necessário caracterizar a área de coleta do solo de TPA como parte dos resultados obtidos até o momento. O solo de TPA foi coletado na região do Baixo Amazonas, no sítio arqueológico localizado na comunidade de Santa Maria do Murituba, região integrada ao município de Parintins-AM e com certa proximidade da divisa com o estado do Pará. O ponto de coleta de material biológico foi georeferenciado com coordenadas S 02° 29'25.41" W 056° 29'10.33".

Esse sítio ainda não havia sido estudado a nível científico, pelo menos em relação à microbiota associada ao solo, fato que agrega ainda mais potencial ao estudo, principalmente por ter sido avaliada microbiota selvagem.

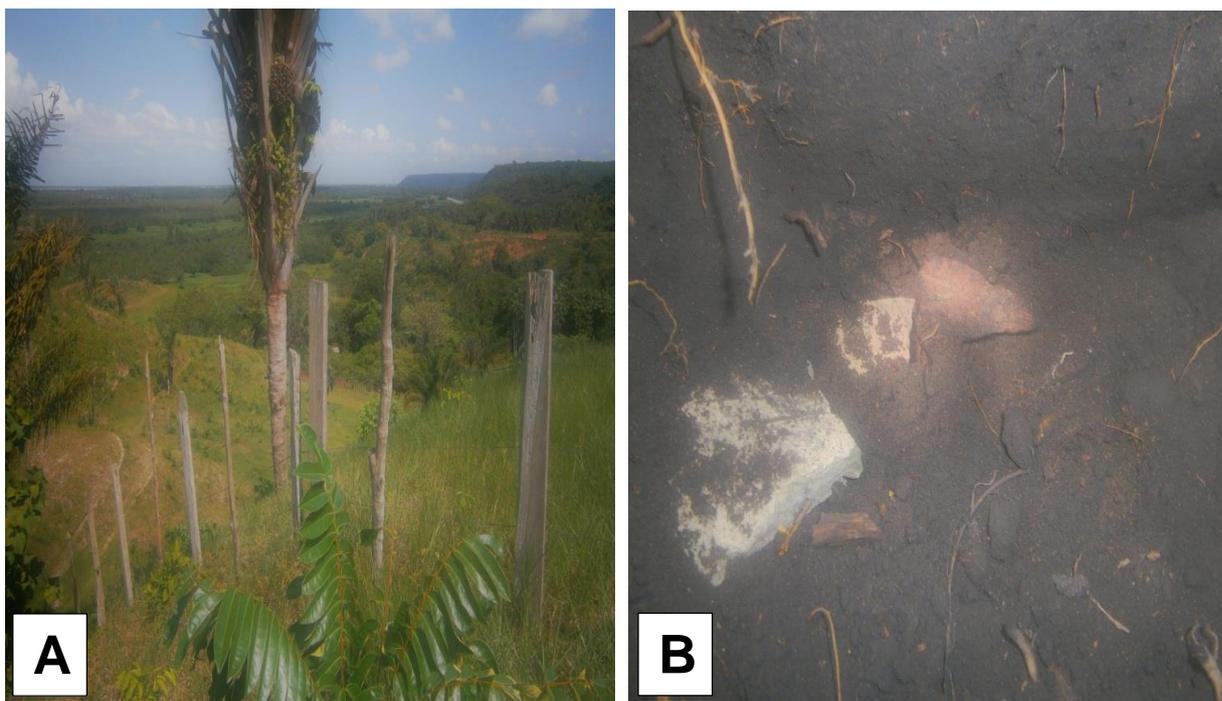
O sítio de estudo de TPA exibe uma unidade de solo negro sobreposto a solo adjacente de origem não antrópica, com fragmentos cerâmicos e objetos indígenas ao longo de toda a sua superfície, além do fato de exibir vegetação abundante, vistosa e aparentemente sadia (Figura 7), características que são observadas na grande maioria dos sítios já estudados. Com relação a sua topografia, o sítio arqueológico de Santa Maria do Murituba exibe vista privilegiada para todos os lados, sendo o rio Amazonas uma das paisagens exibidas a pouca distância, outra característica que sustenta a presença deste sítio nessa região (Figura 8).

Figura 7 – **A)** Imagem da área de coleta de Terra Preta Antropogênica do sítio arqueológico de Parintins e **B)** Coleta do solo de Terra Preta Antropogênica



Fonte: Wanderley Cid. 2015.

Figura 8 – **A)** Vista do ponto de coleta do solo de Terra Preta Antropogênica e **B)** Presença de cerâmicas no solo de Terra Preta Antropogênica.



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS LEVEDURIFORMES DE TPA

O isolamento em cultivo puro de colônias com morfologia sugestiva de leveduras ou de fungos semelhantes a leveduras foram obtidos através de três repiques sucessivos no mesmo meio de cultura de isolamento (TAKASHIMA; NAKASE, 2001). Considerando as referências consultadas, acredita-se que este procedimento permita o isolamento de um maior número de espécies através de metodologias dependentes de cultivo (HONG; LEE; BAE, 2002; HUI et al., 2011).

O isolamento das leveduras foi realizado através da técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*), onde foi utilizado para esse procedimento o meio de cultura Diclorana Rosa Bengala Cloranfenicol Ágar (DRBC). Este meio de cultura também foi utilizado no estudo de Pereira et al. (2010) que avaliou a presença e adinâmica de fungos em fontes de água potável através de métodos dependentes de cultivo e ferramentas moleculares. Outro estudo que utilizou o DRBC foi o realizado por Faia (2011) quando utilizou o meio para isolar e identificar fungos filamentosos e leveduras em redes de distribuição de água. Outro meio de cultura utilizado visando o aumento na taxa de isolamento de leveduras foi o caldo extrato de levedura-malte (YM) modificado com a adição de cloranfenicol, seguido de plaqueamento em meio sólido de YM, também modificado por adição de cloranfenicol visando à eliminação de propágulos bacterianos. Este meio de cultivo foi utilizado no estudo realizado por Torrezan; Eiroa; Pfenning, (2000) que usaram o meio para isolar fungos de frutas, polpas e ambiente industrial. Dessa forma foi considerado eficiente para utilização em nosso estudo.

A partir da amostra de TPA, um total de 88 colônias de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (*yeast-like fungi*) de diferentes morfotipos, que se apresentaram macroscopicamente distantes na placa, foram selecionados e purificados pela técnica de esgotamento em placa de Petri, através de três repiques consecutivos em ágar extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD).

5.3 CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS OBTIDOS DE TPA

Os resultados das características morfológicas dos isolados leveduriformes de TPA podem ser visualizados na Tabela 1 do **Apêndice A**.

Dos 88 isolados leveduriformes, 42 (quarenta e dois) isolados (47,8%) apresentaram cor da colônia creme, 15 (quinze) isolados (17,04%) cor branca, 8 (oito) isolados (9,09%) apresentaram cor amarelada, 7 (sete) isolados (7,9%) apresentaram cor rosa escuro, 10 (dez) isolados (11,36%) apresentaram cor rosa claro, 5 (cinco) isolados (5,7%) apresentaram cor da colônia laranja/creme e apenas 1 (um) isolado (1,13%) do total apresentou a cor esbranquiçada. Os isolados foram avaliados quanto ao brilho da colônia, onde, 43 (quarenta e três) isolados (48,8%) apresentaram brilho opaco e 45 (quarenta e cinco) isolados (51,3%) apresentaram colônias brilhosas.

A superfície da colônia foi avaliada e 31 (trinta e um) isolados (35,2%) apresentaram superfície lisa e 57 (cinquenta e sete) isolados (64,7%) apresentaram características de superfície rugosa. Quanto a consistência da colônia 46 (quarenta e seis) isolados (52,3%) apresentaram consistência cremosa e 42 (quarenta e dois) isolados (47,7%) obtiveram características mucoide. Os 88 isolados foram analisados quanto à forma da célula, onde 50 (cinquenta) isolados (56,8%) apresentaram forma circular, 17 (dezessete) isolados (19,3%) forma oval, 8 (oito) isolados (9,1%) forma alongada, 7 (sete) isolados (7,9%) forma rizoide, 4 (quatro) isolados (4,5%) forma puntiforme e apenas 2 (dois) isolados (2,3%) apresentaram forma lenticular. O tamanho da célula também foi avaliado nos 88 isolados leveduriformes, onde 34 (trinta e quatro) isolados (38,6%) apresentaram tamanho médio, 23 (vinte e três) isolados (26,1%) apresentaram tamanho grande e 31 (trinta e um) isolados (35,2%) apresentaram tamanho da célula pequeno.

5.4 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE TPA

Os resultados com a identificação fenotípica dos isolados leveduriformes de TPA podem ser visualizados na Tabela 2 do **Apêndice B**.

As 88 colônias com morfologia leveduriforme isoladas, foram caracterizadas fenotipicamente. Quanto a forma da célula, 37 (trinta e sete) isolados (42,04%) apresentaram forma globosa, 32 (trinta e dois) isolados (33,3%) apresentaram forma elipsóide, 8 (oito) isolados (9,1%) triangular, 8 (oito) isolados (9,1%) apiculada e 3 (três) isolados (3,4%) apresentaram forma celular taloide. Para a avaliação do

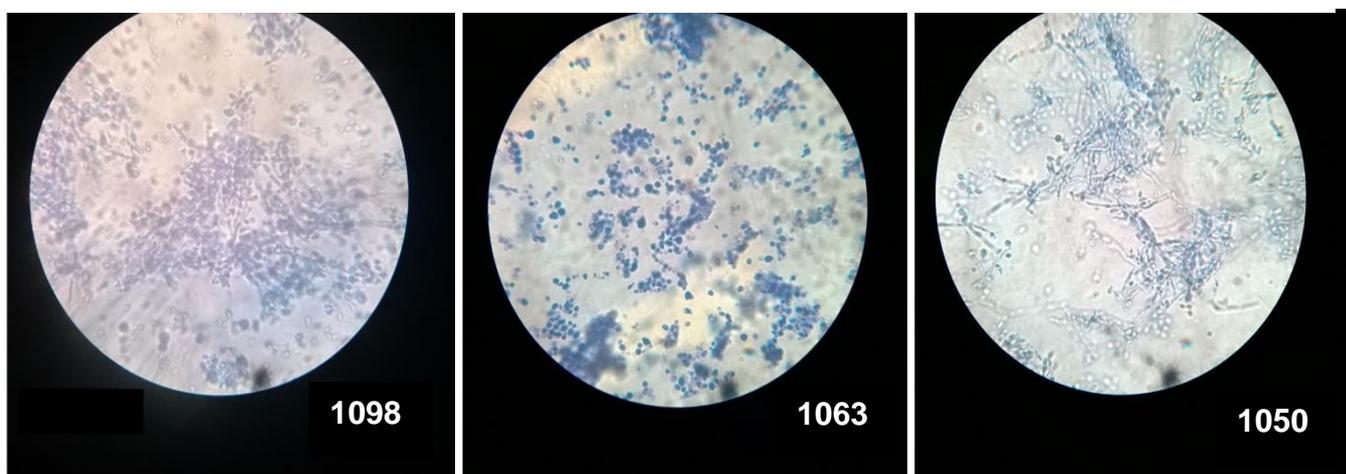
tamanho da célula 30 (trinta) isolados (34,1%) apresentaram tamanho médio, 21 (vinte e um) isolados (23,8%) apresentaram tamanho grande e 27 (vinte e sete) isolados (30,6%) apresentaram tamanho de célula pequeno. Quanto a reprodução, 28 (vinte e oito) isolados (31,8%) se reproduzem por formação de brotamento, 37 (trinta e sete) isolados (42,04%) se reproduzem por fissão, 9 (nove) isolados (10,2%) apresentaram ascósporos e 14 (quatorze) isolados (15,9%) apresentaram balistosporos. Quanto a formação de micélio, 22% dos isolados apresentaram pseudohifas.

Figura 9 - Macromorfologia de leveduras isoladas de Terra Preta Antropogênica destacando a variação de cor, superfície e margem das cepas leveduriformes.



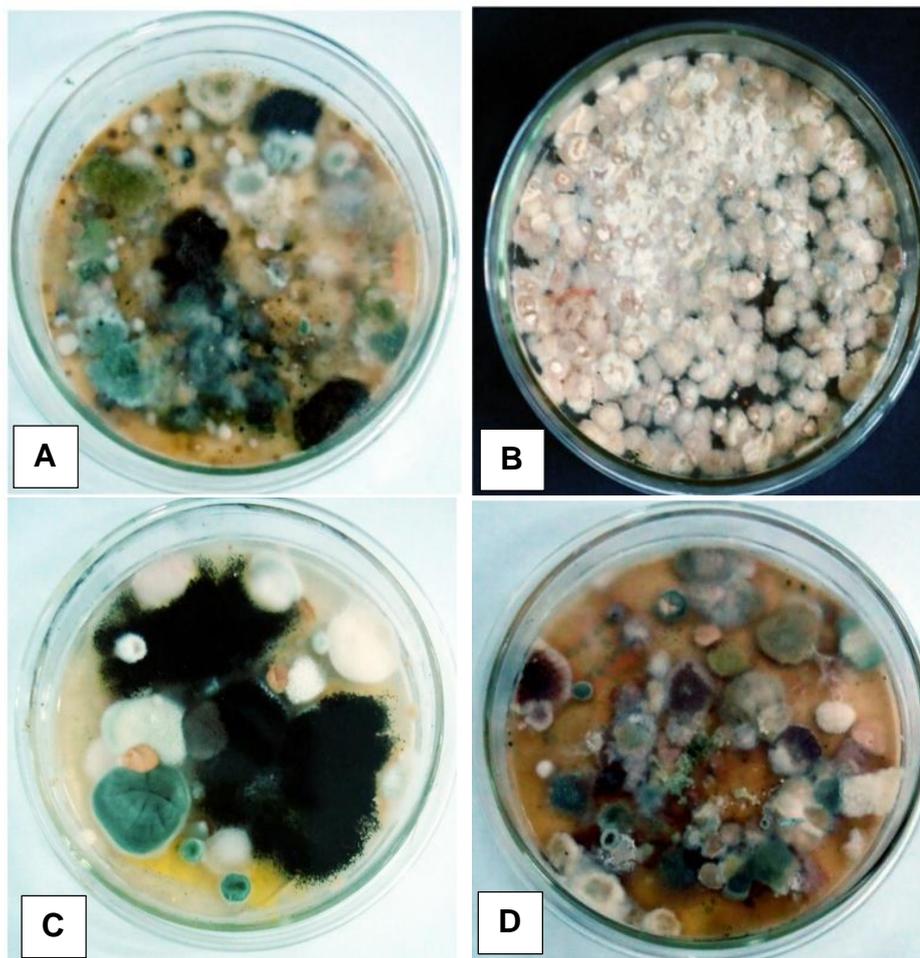
Fonte: Wenderson Cid. 2015

Figura 10 - Micromorfologia de leveduras isoladas de Terra Preta Antropogênica.



Fonte: Wenderson Cid. 2015

Figura 11 – A figura mostra um plaqueamento clássico, ressaltando a diversidade microbiana presente no solo de: **A)** Terra Preta Antropogênica de Parintins – Am, **B)** Latossolo; **C)** Solo de floresta; **D)** Terra Preta Antropogênica de Itacoatiara – AM.



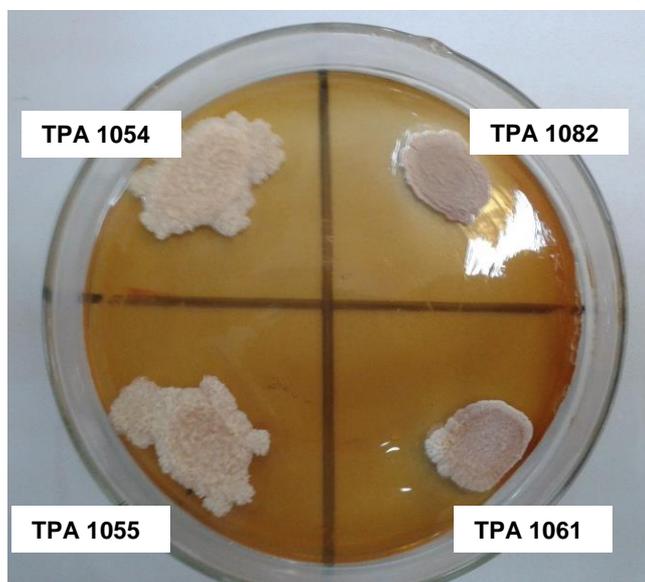
Fonte: Milthes Guedes. 2015.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ISOLADOS

Os 88 isolados leveduriformes foram examinados em relação à tolerância ao etanol. Primeiramente todos os isolados foram cultivados em placas com meio ágar YEPD contendo 15% de etanol. Para esse teste foram obtidas 64 cepas positivas (+), mostrando que a grande maioria foi suscetível a esta concentração de etanol. No entanto, foram visíveis as deformações na morfologia colonial das cepas de acordo com a (Figura 9). As 64 cepas consideradas positivas para o etanol 15% foram então testadas para etanol 30% em placa. Das 64 cepas testadas, somente 5 cepas toleraram esta concentração de etanol. Estes resultados apesar de apresentarem um baixo percentual atingido, são compatíveis com os resultados observados no estudo de Costa (2011) que caracterizou cepas leveduriformes para produção de etanol celulósico. Este testou 62 cepas leveduriformes quanto a tolerância ao etanol 30% e obteve apenas 10 cepas tolerantes a essa concentração de etanol. Tais cepas obtidas neste presente estudo podem oferecer um grande recurso biotecnológico e despertam interesse principalmente na indústria de biocombustíveis, por oferecem condições metabólicas para a produção de etanol de alto rendimento (AMORIM, 2011)

Os 88 isolados foram testados para tolerância a glicose 50%, onde nenhum obteve crescimento em placa, sendo considerados negativos (-), bem como para o teste de termotolerância a 50° C, que também não proporcionou resultados positivos.

Figura 12 – Teste tolerância ao etanol 30% em placa.



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS LEVEDURIFORMES DE TPA

A identificação molecular dos 88 isolados não foi realizada até o momento.

5.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO EXTRACELULAR E TESTE PARA FENÓTIPO *KILLER*

Os resultados com a avaliação do perfil enzimático e atividade *killer* dos isolados leveduriformes de TPA podem ser visualizados na Tabela 3 do **Apêndice C**.

Dos 88 isolados, 13 (treze) isolados (14,8%) apresentaram atividade ótima (++) para o teste de produção de amilase, esse resultado pode ser comparado com o estudo realizado por Duarte (2009) que identificou e avaliou isolados de fungos provenientes de solo quanto sua capacidade de produção amilolítica e obteve 36 isolados positivos para produção da enzima. É importante ressaltar que esse teste foi repetido duas vezes, pois, a temperatura de incubação utilizada no presente estudo foi de 30°C e segundo Sivaramakrishnan et al.(2006) a influência da temperatura na produção de amilase está relacionada com o crescimento do microrganismo, sendo importante testar até a temperatura de 35°C segundo os autores. Microrganismos produtores dessa enzima são muito visados pela indústria do amido, principalmente por realizarem hidrólise e modificação de matéria bruta (SCHWAN, 2007).

25 (vinte e cinco) isolados (22%) revelaram-se fortemente positivos (++) para o teste de produção de caseinase. 13 (treze) isolados (14,8%) apresentaram atividade ótima (++) para a enzima gelatinase. Os resultados mostram que o número de isolados com atividade caseinolítica são inferiores aos obtidos por Landell et al. (2005) que obtiveram cerca de 49% de isolados produtores de caseinase. No entanto, os resultados obtidos pelos autores para a produção da enzima gelatinase foi semelhante ao obtido neste estudo, com 14% de produtores degelatinase. Em outro estudo, Mautone (2008) obteve 55,5% de cepas positivas para a produção da enzima caseinase e 14% para a produção de gelatinase a partir de 126 isolados leveduriformes. Estes resultados mostram a semelhança nas percentagens obtidas e quando comparadas ao presente estudo. Essas proteases são amplamente

utilizadas na indústria de alimentos, principalmente nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais como o molho soyo, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja e na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis neles contidas em altas concentrações (RAO et al.,1998). As proteases são também empregadas na produção de derivados lácticos como os queijos, atuando na maturação e desenvolvimento da textura e sabor, devido à ação das proteases na beta-caseína do leite (VISSER, 1993).

Para o teste de produção de celobiase, 60 (sessenta) isolados apresentaram atividade ótima (++), 4 (quatro) apresentaram-se positivos (+) e 2 (dois) apresentaram atividade fraca (W) para a enzima (75%). Esse alto percentual de leveduras positivas para a produção de enzimas confere com os resultados obtidos por Mautone (2008) que a partir de 126 isolados leveduriformes, obteve 74,8% de positivos para a produção da enzima. Aparentemente a produção de celobiase é comum em isolados de solo, o que é esperado, pois a celobiose é um componente da parede celular de plantas e estas se encontram bem distribuídas na matriz superficial do solo (LYND et al., 2002).

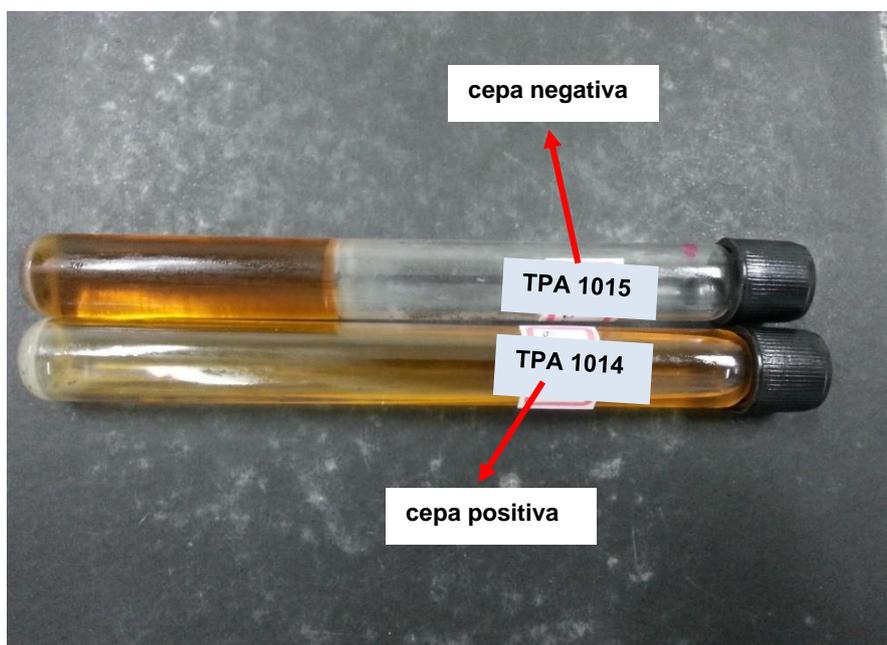
Para o teste de produção de esterase, 46 (quarenta e seis) isolados apresentaram atividade ótima (++) para a produção da enzima e 3 (três) foram fracamente positivos (55,7%). Estes resultados foram compatíveis aos obtidos no estudo de Farias (2008) que estudou a produção de enzimas hidrolíticas isoladas de solo de área preservada em Roraima, Brasil onde obteve 181 isolados leveduriformes, desses, 70% foram positivos para a produção da enzima, confirmando que solos que possuem mínimas agressões ecológicas, podem ser uma importante fonte de leveduras produtoras de esterases. As esterases podem ser usadas em solventes orgânicos, tornando-se uma das enzimas mais requisitadas na síntese orgânica e em vários processos industriais, como na indústria de detergentes, na indústria de alimentos, na indústria oleoquímica, na indústria do papel (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Para o teste de atividade *killer*, das 88 cepas testadas, 22 (vinte e duas) cepas (25%) apresentaram atividade quando semeadas em placas com a levedura patogênica *Candida albicans*, pois apresentaram zona de inibição e nenhuma obteve atividade em placas semeadas com *Candida krusei*. Quanto ao número de isolados, o presente estudo se mostra superior ao de Mautone (2008) que obteve apenas 7

cepas positivas para atividade *killer* dentre 175 linhagens testadas. No estudo de Cabral et al. (2009), que avaliou isolados leveduriformes para aplicação contra o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, foram isoladas 155 cepas leveduriformes, e desse total apenas 15 isolados apresentaram atividade micocinogênica, sendo que apenas duas cepas inibiram o crescimento do fitopatógeno. Esses resultados quando comparados ao presente estudo, mostram que o número de isolados de TPA é bastante considerável e possivelmente os isolados podem ser promissores para a aplicação contra fitopatógenos desta natureza.

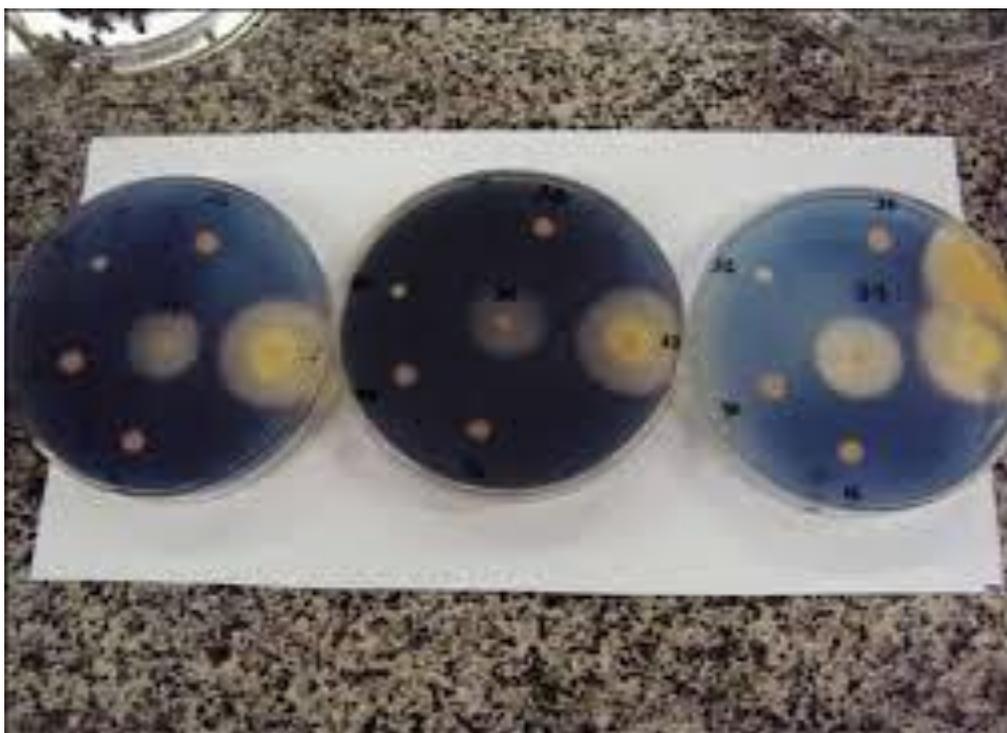
No estudo realizado por Lima et al. (2007), de 230 isolados, apenas 16 isolados leveduriformes apresentaram atividade *killer*. Esses isolados mostraram-se ser fermentadores de alta eficiência para a produção de etanol. Estes resultados indicam que o número de isolados além de ser inferior ao presente estudo, mostra que os isolados de TPA também podem ser testados para essa finalidade, visto que sempre existe uma relação entre o solo e os vegetais ricos em açúcares nele presente. Resultados ainda menores foram obtidos por Vaz (2003) que encontrou 4 isolados dentre 207 representando menos de 2% do total analisado e por Moraes et al. (1997).

Figura 13- Teste positivo para produção da enzima gelatinase por isolado leveduriforme TPA1014, e amostra negativa para produção da enzima por isolado leveduriforme TPA 1015



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

Figura 14 – A figura mostra o teste em placa para produção de amilase, dando destaque a formação do halo que torna – se visível após a aplicação do lugol, sendo o indicativo principal para a produção da enzima.



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

Figura 15. Teste para produção da enzima caseinase com isolados leveduriformes obtidos de Terra Preta Antropogênica. **A)** Cepa controle positivo *E. coli*; **B)** Cepa controle positivo *Bacillus subtilis*; **C)** Cepa controle positivo *Bacillus cereus*; **D)** Cepa TPA1021 positiva para enzima; **E)** Cepa TPA1024 negativa para a enzima.

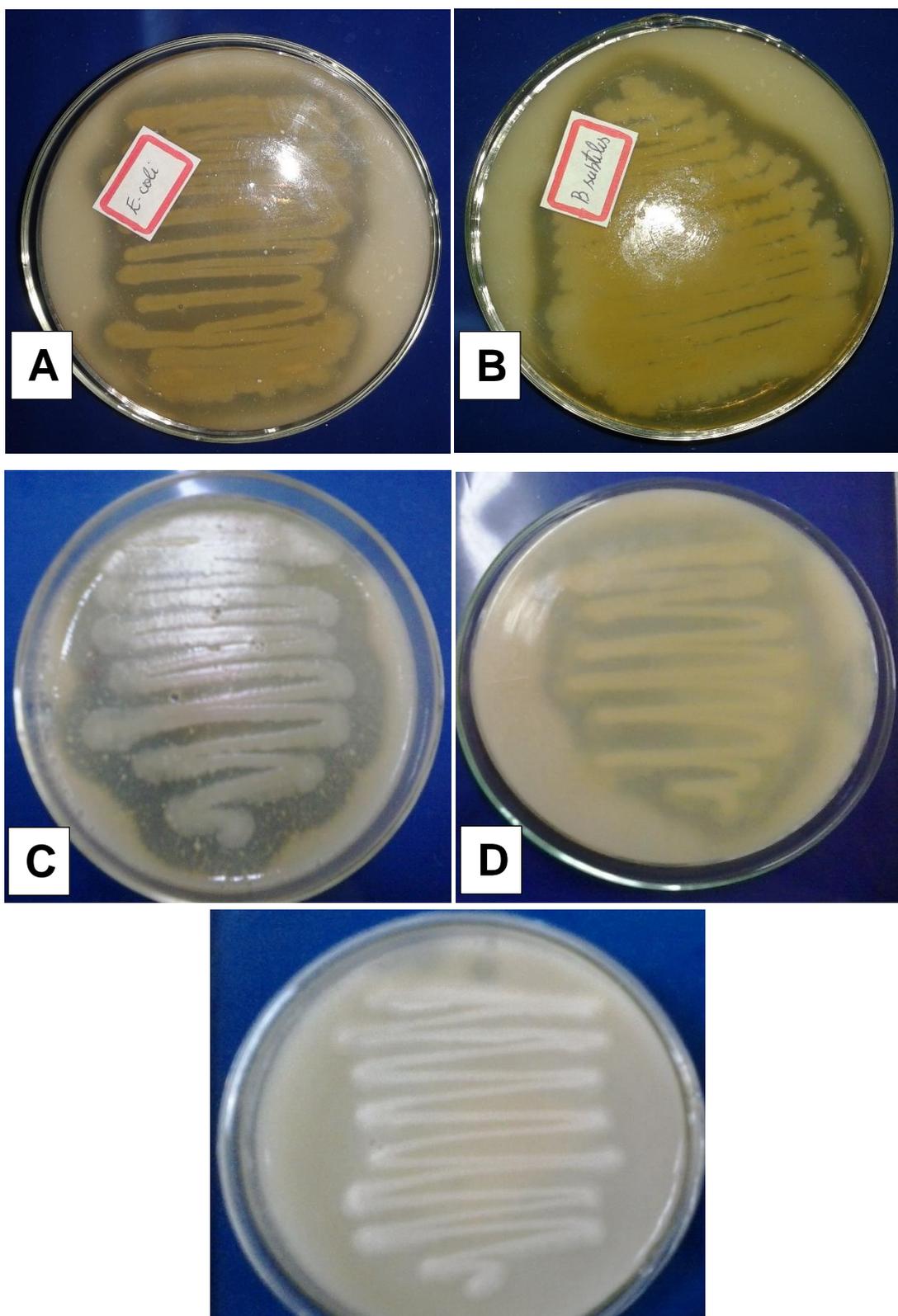
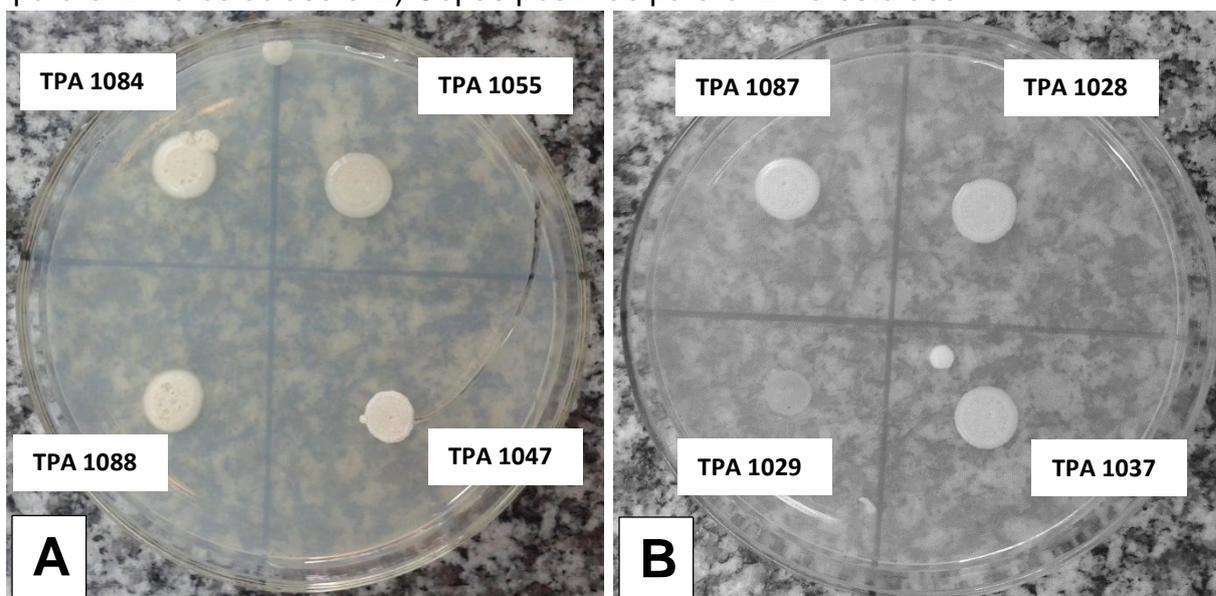
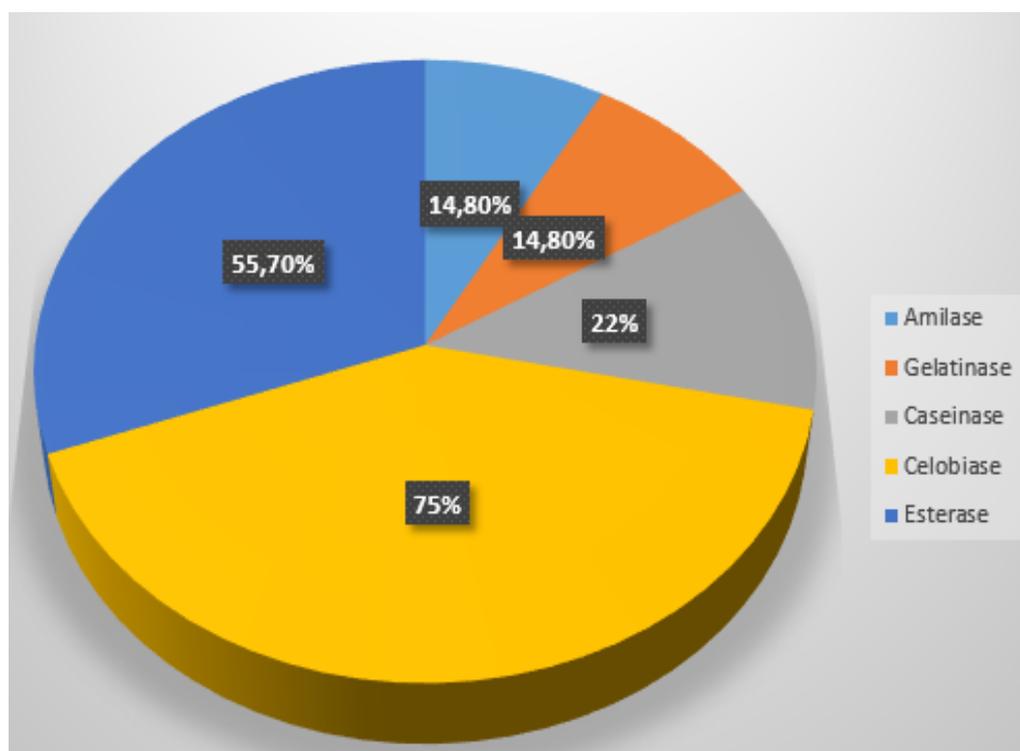


Figura 16- Teste para **E** produção das enzimas celobiase e esterase dos isolados leveduriformes obtidos de solo de Terra Preta Antropogênica. **A)** Cepas positivas para enzima celobiase e **B)** Cepas positivas para enzima esterase.



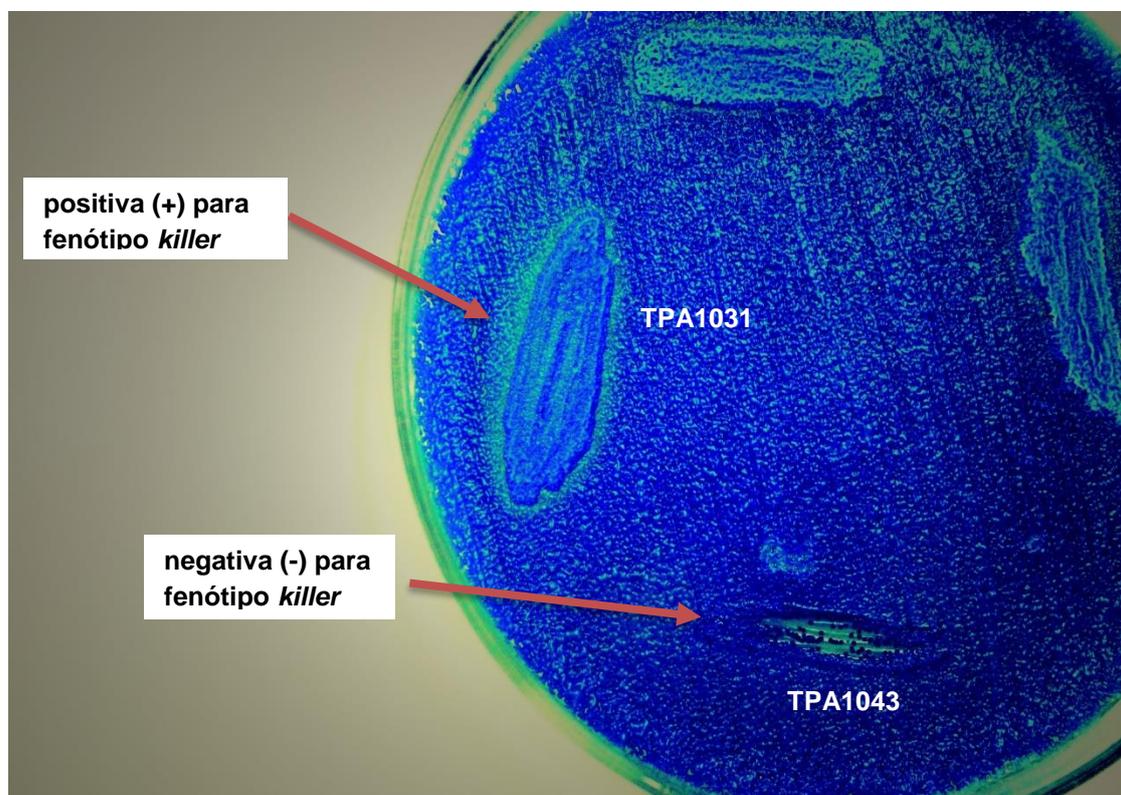
Fonte: Wenderson Cid. 2015.

Figura 17- Percentagem absoluta do perfil enzimático dos isolados de leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

Figura 18 – Teste para fenótipo *killer* em placas com suspensão de *C. albicans* com isolados de levedura obtidos de Terra Preta Antropogênica



Fonte: Wenderson Cid. 2015.

5.8 PROPRIEDADES QUÍMICAS DO SOLO DE TPA

Os resultados das análises químicas podem ser visualizados no Quadro 1. Os cálculos referentes a estas análises químicas do solo de TPA foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Aristóteles de Jesus Teixeira Filho e estão disponíveis no **Apêndice - D**.

Os microrganismos são os principais motores de processos biogeoquímicos do solo. Assim, é importante avaliar as propriedades químicas do solo, e como estas propriedades podem ser relacionadas com perfis microbianos e produção enzimática por microrganismos em diferentes solos (PEIXOTO et al., 2010). Estas mudanças, bem como a falta de uma cobertura vegetal, afetam as populações microbianas selvagens. As variações sazonais de valor do pH do solo mudam o padrão de distribuição das espécies microbianas, uma vez que as bactérias preferem pH neutro para condições alcalinas e leveduras e fungos filamentosos tem preferência por

solos ácidos (BRESOLIN et al., 2010). O valor do pH do solo de TPA deste estudo apresentou-se próximo da neutralidade, precisamente 6,2. Isto favorece tanto o crescimento da população microbiana de fungos quanto de bactérias. Outro fator que pode explicar este valor de pH nos sítios de TPA é a presença de carvão. Oguntunde et al. (2004) observaram um aumento no pH do solo, após a queima parcial de carvão, em consequência do aumento do nível de cátions trocáveis que este material disponibilizou ao solo.

Bons atributos químicos como os observados no presente estudo são compatíveis com os resultados encontrados por Rao et al. (1990) que afirma que a maioria dos microrganismos que encontram-se em solos com alta fertilidade podem ser promissores na produção de enzimas de interesse biotecnológico. Quanto aos atributos químicos como: **K** (24,00 cmol/dm³), **P** (511,28 cmol/dm³), **Na** (-) **Ca** (7,10 cmol/dm³), **Mg** (2,00 cmol/dm³), **Al** (0,10 cmol/dm³), estes apresentaram valores semelhantes aos resultados obtidos por M.C.C Campos et al., (2012) que avaliou atributos químicos de um sítio localizado na cidade de Manicoré – Am. Segundo Steinbeiss et al., (2009), áreas de TPA apresentam elevados níveis de nutrientes, principalmente Ca e P, altos teores de matéria orgânica e atividade biológica mais elevada que os solos adjacentes, o que pode ser reflexo da variação do tempo e da densidade da ocupação humana nas áreas. Os teores elevados de P nas TPAs são resultantes da incorporação, por populações pré-colombianas, de resíduos orgânicos ricos em P, sobretudo espinhas de peixes, ossos de mamíferos e quelônios e, em alguns casos, possivelmente, ossos humanos, ricos em P (LIMA et al., 2002).

Este estudo mostrou pequenas quantidades de alumínio (0,10 cmol/dm³) no solo de TPA. Grandes quantidades de alumínio solúvel elevam a toxicidade do solo para as plantas, e afetam diretamente a estrutura e dinâmica de microrganismos presentes no solo. Como o alumínio compete com outros elementos, tais como nutrientes essenciais, este acaba promovendo o empobrecimento do solo (RUGGIERO et al., 2002). Segundo M.C.C. Campos et al., (2012) a grande maioria dos sítios de TPAs investigados e mesmo os que ainda não foram mencionados na literatura tendem a apresentar baixos teores de alumínio, exceto se algum fator físico interferir na homogeneidade do solo.

No teste de ataque sulfúrico, foi notado o baixo teor de % Fe_2O_3 (1,52) o que classifica o solo como hipoférrico.

Os valores elevados de % P_2O_5 (0,588) nas TPAs são considerados indicativos de atividade antrópica, constituindo uma característica típica marcante dos horizontes antrópicos, independentemente do ecossistema em que se encontram.

Quanto ao teste de Si/Al ou índice Ki, foi identificado um baixo valor (1,08), o que afirma que o solo investigado é dominado por compostos de natureza secundária e elevado grau de intemperismo. O solo investigado encontra-se em área de terra firme, conhecida por não sofrer os impactos causados pela elevação das águas. Segundo Lima (2001), solos que não são atingidos pelas águas tendem a apresentar índices mais elevados de intemperismo, pois, não incorporam em sua estrutura, matéria orgânica suficiente para atribuir maiores valores de fertilidade.

Apesar de ser considerado intemperizado, o solo investigado apresenta alta capacidade de troca catiônica (CTC), uma característica que torna-se marcante em solos de TPA. Essa troca de cations permite que o solo estabilize nutrientes e distribua-os de forma homogênea ao longo da camada superficial do solo. Existe uma relação da CTC com a profundidade do solo, ou seja, de acordo com a profundidade atingida nos perfis do solo, menor a capacidade de troca de cations (LIMA, 2001). Glaser et al. (2001) afirma em seu estudo que, a alta reatividade de matéria orgânica, bem como a presença de uma maior atividade microbiana na região superficial dá-se a grande distribuição do carvão pirogênico "Bio Char".

Quanto a presença de matéria orgânica (MO), o solo investigado forneceu ótimos resultados, pois, foi classificado como altamente fértil e considerado um solo orgânico. Em resumo, esta pesquisa tem aumentado o conhecimento sobre a estrutura das comunidades microbianas e composição química dos sítios arqueológicos do baixo Amazonas.

5.9 PCR-DGGE DAS AMOSTRAS DE SOLO DE TPA

A avaliação de diferentes primers para analisar as comunidades bacterianas e fúngicas de TPA em um sítio arqueológico indígena do baixo Amazonas, bem como os perfis de DGGE bacterianos e fúngicos podem ser visualizados na (Figura 15, Figura 16 e Tabela 5). Estes perfis exibem a espécie dominante e a intensidade de cada banda indica sua abundância relativa. Em relação à ecologia microbiana, a técnica de PCR-DGGE revelou uma diversidade de espécies microbianas existentes nas amostras de solo de TPA. Neste estudo, quatro dos principais primers para PCR-DGGE foram utilizados. Para selecionar o perfil das comunidades microbianas foram utilizados dois pares de primers dirigidos a diferentes regiões do 16S rDNA, nomeadamente 968fGC/1401r (região V6-V8) e 338fGC/518r (região V3) usados para a avaliação de procaríotos, e os pares de primers ITS1fGC/ITS4r e NS3fGC/YM951r para segmentação fúngica das regiões espaçador interno transcrito (ITS) e 18S rDNA (Tabela 4). Os perfis de uma comunidade microbiana podem ser altamente dependentes dos iniciadores (*primers*) de PCR utilizados (ANDERSON ;CAIRNEY, 2004; SCHWARZENBACH et al., 2007).

A diversidade microbiana por PCR-DGGE descrita como o número total e abundância das comunidades pode não ser determinável em solos, devido às limitações nas definições e métodos taxonômicos; assim, a composição das comunidades em geral pode ser descrita por estruturas comunitárias (ANDERSON ;CAIRNEY, 2004; SCHWARZENBACH et al., 2007). Quando as amostras de solo de TPA foram submetidas à análise direta por PCR-DGGE, informações importantes se tornaram disponíveis.

Espécies presentes em baixas concentrações, ocasionalmente, não poderiam produzir uma banda DGGE detectável. Assim, é possível que o DGGE possa mascarar mudanças da comunidade dos organismos de baixa abundância em nosso estudo. Este fato descreve a limitação do DGGE em visualizar apenas as espécies predominantes de uma comunidade microbiana (PEREIRA et al., 2011). No entanto, uma das vantagens da DGGE, é que ela permite a comparação de comunidades microbianas totais de diferentes amostras por meio de análise padrão. Entre os gêneros e espécies de leveduras e fungos encontrados neste estudo, *Lachancae meyersii* é a primeira espécie do gênero encontrada em solo amazônico. Segundo

Fell et al. (2004) todos os isolamentos das outras espécies de *Lachancea* foram a partir de plantas, produtos vegetais e insetos associadas a plantas, frutos ou alimentos. O nicho ecológico específico de *Lachancea meyersii* não foi determinada. O habitat pode ser o solo ou, eventualmente, em conjunto com plantas. *Zygosaccharomyces* é um gênero de levedura muitas vezes associado com a deterioração dos alimentos. As características gerais de leveduras *Zygosaccharomyces* são: fermentação de açúcares, osmotolerância, resistência a preservativos incluindo sulfito, ácido sórbico e etanol, formação de ascósporos resistentes ao calor. *Zygosaccharomyces* inclui alguns dos organismos osmotolerantes mais conhecidos, são leveduras capazes de resistir a concentrações de conservantes de alimentos vastamente superiores aos normalmente encontrados. (THOMAS; DAVENPORT 1985).

O gênero *Cladosporium* é um bolor negro, embora não “tóxico”. *Cladosporium* constitui um dos maiores gêneros de Hypomycetos, compreendendo mais de 772 nomes. Estas espécies estão entre os mais comuns fungos isolados do ambiente, presentes quase em qualquer lugar do mundo. Muitas espécies são patógenos de plantas, enquanto outros são encontrados regularmente como contaminantes e agentes de deterioração nos alimentos ou produtos industriais, bem como sendo freqüentemente associados com queixas asmáticas (MUKHERJEE; MITTAL, 2005). *Cladosporium* cresce geralmente em sistemas de corrente alternada, quando não há ventilação suficiente, às vezes em paredes, vigas de tetos e em geral, ambientes fechados e sem corrente de ar (MUKHERJEE; MITTAL, 2005). Contudo, os dados mais recentes sugerem que estão presentes na maioria das amostras de solo (PAUL et al., 2008).

O gênero *Candida* é comumente encontrada no solo. Várias espécies de *Candida* têm sido relatadas em solos florestais em Taiwan, incluindo as novas espécies de *Candida jianshihensis*, *Candida yuanshanicus*, *Candida dajjaensis* e *Candida sanyiensis* (MEYER et al., 1998). Shin et al. (2001) também encontraram o gênero *Candida* em solos da Coreia. Os nossos resultados mostraram a presença de várias espécies bacterianas no solo de TPA (Fig. 2, Fig. 3 e Tabela 4).

O gênero bacteriano *Bacillus sp.* geralmente é encontrado em amostras de solo (QUIRINO et al., 2009). Gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, e *Escherichia* foram encontrados neste estudo. Estes gêneros estão associados a

pequenos mamíferos e insetos e são encontrados naturalmente no solo, água e plantas (QUIRINO et al., 2009).

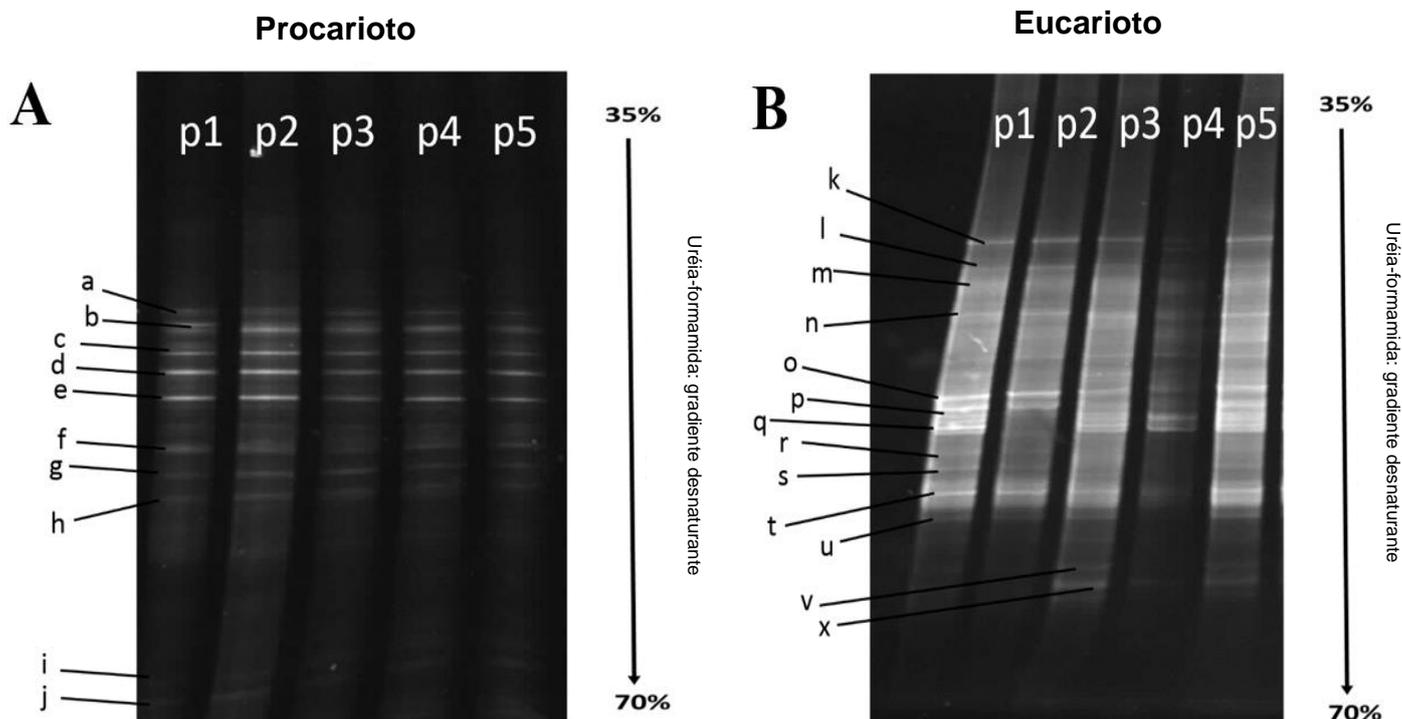
Gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* não são comumente encontrados no solo, no entanto, verificou-se neste estudo. A presença desta espécie no solo está associada com plantas e frutas presentes na vegetação da Amazônia. Este estudo também mostrou a presença de actinobactérias como *Streptomycesgelaticus* (EU741111.1) e *Microbacterium azadirachtae* (EU912487.1).

Actinobactérias são bactérias gram-positivas, morfológica e fisiologicamente muito diversificadas com alto teor de GC em seu DNA, além de serem um dos principais filos dentro domínio *Bacteria*. A classe Actinobacteria contém seis ordens: Acidimicrobiales, Rubrobacterales, Coriobacterales, Bifidobacteriales, Actinomycetales e Nitriliruptorales. Actinobactérias são colonizadoras dominantes em solos. Muitas espécies produzem enzimas extracelulares de degradação de macromoléculas, tais como a lignina, celulose, quitina e amido. Portanto, Actinobactérias ocorrem frequentemente na degradação de matéria orgânica (SCHAFER et al., 2010). Na natureza, Actinobactérias desempenham um papel importante no ciclo de compostos orgânicos e têm sido associadas com a produção de matéria orgânica do solo, devido aos seus pigmentos pretos chamados melaninas, que estão relacionados, em certos aspectos, a ácido húmico no solo (SCHAFER et al., 2010).

No presente estudo, foi identificado o gênero *Streptomyces*. O gênero *Streptomyces* tem sido o foco de pesquisas, devido à aplicabilidade comercial de substâncias produzidas bem como a sistemática deste grupo, os quais foram modificadas com avanços em biologia molecular (SOUZA et al., 2008). Neste estudo foi também identificado o gênero *Microbacterium*. O gênero *Microbacterium* pode ser isolado do ar, solo, água, fungos, plantas e seres humanos. Muitos *Microbacterium*spp. desempenham um papel importante na saúde humana, indústria, agricultura, ambiente, bioengenharia, biotecnologia e tem aplicabilidade na produção de exopolissacarídeos, atuam na degradação do óleo, degradação do xileno, tolerância a metais e produção de biossurfactantes (LIN et al., 2012). A aplicação de PCR-DGGE como técnica independente de cultivo para a análise das comunidades bacterianas e fúngicas, confirmou que no sítio arqueológico deste presente estudo existe uma grande diversidade de organismos que são

indispensáveis, principalmente para o equilíbrio deste solo. Outra abordagem através dessa técnica molecular foi a identificação de grupos microbianos que nunca haviam sido relatados em sítios arqueológicos indígenas do baixo Amazonas, como as bactérias *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* bactérias e a levedura *Lachancea meyersii*.

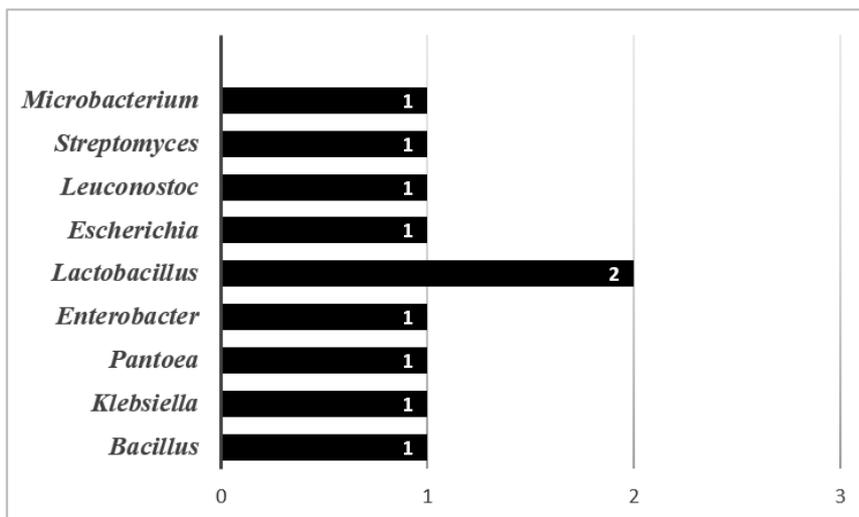
Figura 19 - Perfis de PCR-DGGE de Procariotos (A) e comunidades de eucariotos (B) em fragmentos de rDNA amplificados a partir de Terra Preta Antropogênica de um sítio arqueológico indígena do baixo Amazonas. (A) Os parentes mais próximos dos fragmentos sequenciados, com base em uma pesquisa no GenBank ($\geq 99\%$ de similaridade), foram bandas: a - *Bacillus macerans* (AB281478), b - *Klebsiella pneumonia* (CP000964), c - *Pantoea agglomerans*, d - *Enterobacter cowanii* (FJ357832), e - *Lactobacillus casei* (EU626005.1), f - *Escherichia coli* (EU026432), g - *Leuconostoc citreum* (FJ378896.1), h - *Streptomyces gelaticus* (EU741111.1), i - *Microbacterium azadirachtae* (EU912487 0,1), j - *Lactobacillus paracasei* (AB368902.1). (B) Os parentes mais próximos dos fragmentos seqüenciados, com base em uma pesquisa no GenBank ($\geq 98\%$ de similaridade), foram bandas: k - *Zygosaccharomyces* sp. (AF017728.1), l - *Lachancea meyersii* (AY645661.1), m - Ascomycota Uncultured (GQ404775), n - Zygomycete Uncultured (AY969178), o - *Saccharomyces cerevisiae* (EU019225.1), p - *Cladosporium oxysporum* (AJ300332.1), q - *Cladosporium* sp. (FJ950740), r - *Candida glabrata* (AY939793.1), s - *Candida tropicalis* (EF194842.1), t - *Candida orthopsilosis* (FN812686.1), u - *Candida* sp. (G1190714325), v - *Penicillium oxalicum* (JF309107), x - *Candida labiduridarum* (FJ623629.1). p = pontos coletados.



Perfis de DGGE a partir de dois pares de primers:
 Procarioto (968fGC/1401r e 338fGC/518r)
 Eucarioto (ITS1fGC/ITS4 e NS3fGC/YM951r)

Figura 20 - Abundância de gêneros microbianos em solo de Terra Preta Antropogênica em um sítio arqueológico indígena do baixo Amazonas. (Números significam abundância das espécies).

Diversidade de gêneros (procaríotos)



Diversidade de gêneros (eucariotos)

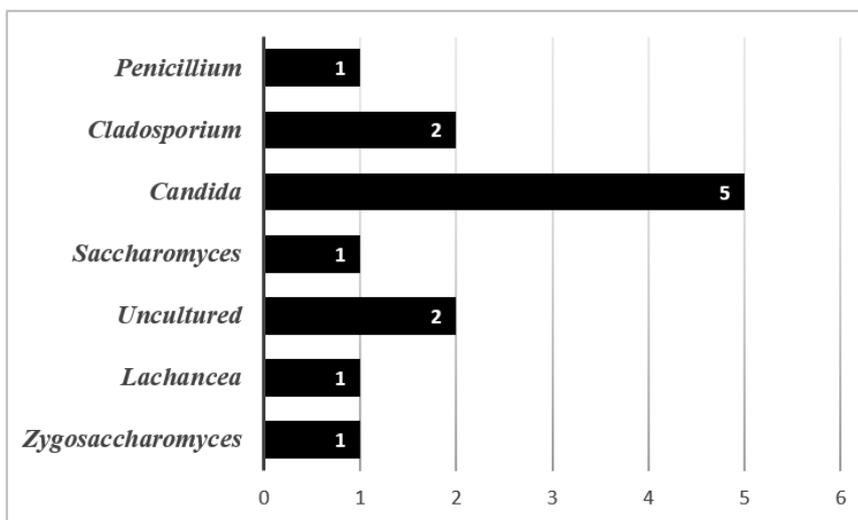


Tabela 4 – PCR-DGGE, primers utilizados para detectar comunidades de fungos e bactérias de solo de Terra Preta Antropogênica em um sítio arqueológico do baixo Amazonas.

Primer	Sequência (5' – 3')	Comunidade	Target	PCR condições	DGGE condições	Referências
968fGC 1401r	AAC GCG AAG AAC CTT AC grampo GC conectado a5' de fim968f CGG TGT GTA CAA GAC CC	Bacteriana	V6-V8 região do 16S rRNA gene	condição 1	16h a 70 V a60°C.	b
ITS1fGC ITS4r	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G grampo GC conectado a 5' de fim ITS1gc TCCTCCGCTTATTGATATGC	Fúngica	ITS região do rDNA	condição 1	16h a 70 V a60°C.	a
338fGC 518r	GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG grampo GC conectado a5' de fim 338fgc ATT ACC GCG GCT GCT GG	Bacteriana	V3 região do 16S rRNA gene	condição 1	6h a 70 V a60°C.	b
NS3fGC YM951r	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC grampo GC conectado a5' de fim NS3gc TTG GCA AAT GCT TTC GC	Fúngica	18S região do rDNA	condição 2	16h a 70 V a60°C.	b

Grampo GC - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GG , f - forward primer; r - reverse primer

^a Wallis et al. (2010); ^bMagalhães et al. (2010)

condição 1 – Desnaturado por 5 min a 95°C. 30 ciclos: desnaturação a 92°C por 60s, anelamento a 55°C por 60s e extensão a 72°C por 60s. Extensão Final por 10 min a 72°C. condição 2 - 35 ciclos em vez de 30.

Tabela 5–Diversidade Molecular de bactérias e fungos de solo de Terra Preta Antropogênica de um sítio arqueológico do baixo Amazonas.

	Bactérias	Leveduras	Fungos filamentosos
Ponto 1	<i>Bacillus macerans</i> (AB281478), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CP000964), <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter cowanii</i> (FJ357832), <i>Lactobacillus casei</i> (EU626005.1), <i>Escherichia coli</i> (EU026432), <i>Leuconostoc citreum</i> (FJ378896.1), <i>Streptomyces gelaticus</i> (EU741111.1), <i>Microbacterium azadirachtae</i> (EU912487.1), <i>Lactobacillus paracasei</i> (AB368902.1)	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. (AF017728.1), <i>Lachancea meyersii</i> (AY645661.1), Uncultured Ascomycota (GQ404775), Uncultured zygomycete (AY969178), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (EU019225.1), <i>Candida glabrata</i> (AY939793.1), <i>Candida tropicalis</i> (EF194842.1), <i>Candida orthopsilosis</i> (FN812686.1), <i>Candida</i> sp. (G1190714325)	<i>Cladosporium oxysporum</i> (AJ300332.1), <i>Cladosporium</i> sp. (FJ950740)
Ponto 2	*	*	*
Ponto 3	*	* <i>Candida labiduridarum</i> (FJ623629.1)	* <i>Penicillium oxalicum</i> (JF309107)
Ponto 4	*	* <i>Candida labiduridarum</i> (FJ623629.1)	* <i>Penicillium oxalicum</i> (JF309107)
Ponto 5	*	* <i>Candida labiduridarum</i> (FJ623629.1)	* <i>Penicillium oxalicum</i> (JF309107)

* Mesmas espécies do ponto 1

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo representa somente um esforço inicial para a exploração biotecnológica da riqueza metabólica e estrutural da diversidade microbiana do solo Amazônico de TPA do sítio arqueológico do baixo Amazonas. Este trabalho vem permitindo o vislumbre do grande potencial biotecnológico encontrado na amostra utilizada e possivelmente poderá abrir portas não apenas para a aplicabilidade dessas enzimas, mas também para a realização de estudos que atribuam novas informações sobre a dinâmica entre a microbiota, aspectos físicos e químicos e de modo geral, todos os fatores envolvidos na fertilidade ímpar apresentada no solo de Terra Preta Antropogênica.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, J. et al. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43 p.328-336, 1997.
- AMANN, R. I; LUDWIG, W. SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 91, p. 1267 – 1275, 2011.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v.6, p. 769-779, 2004.
- BARNETT, J.A., et al. **Yeasts, Characteristics and Identification**. 4th Ed. Cambridge University Press, 2000. 811p.
- BASTOS, A. E. R.; MOON, D. D.; ROSSI, A.; TREVORS, J. T.; TSAI, S. M. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 174, p. 346-352, 2000.
- BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p.1935-1945, 1996
- BORNEMAN, J.; TRIPLET, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n.7, p. 2647-2653, 1997.
- BRESOLIN J.D. et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**,v.41, p. 391-403, 2010.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p.214-216, 2004.

CABRAL, A.S. et al. Killer yeast inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.108-110, 2009.

CAN SU. et al. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. **Appl Microbiol Biotechnol**, Verlag, v. 93, p. 993-1003, 2011.

CANNAVAN, F.S. **A estrutura e composição de comunidades microbianas (Bacteria e Archaea) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de índio da Amazonia Central**. 2011. 138 f. Tese (Biologia na agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

COSTA, D.A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para a produção de etanol celulósico**. 2011. 74 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

DUARTE, W.M. **Produção de metabólitos secundários por fungos de solo**. 2009. 33 f. Trabalho de conclusão de curso (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Rio Grande do Sul, 2009.

ERICKSON, C. Historical ecology and future explorations. In: LEHMANN, J.; KERN,D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (org). **Amazonian dark earths**: origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 455-550.

FAIA, A.M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. 2011. 52 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em biologia celular e biotecnologia) Faculdade de ciências, departamento de biologia vegetal, Universidade de Lisboa, 2011.

FALESI, I.C. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia brasileira. In: INSTITUTO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO NORTE.

Zoneamento agrícola da Amazônia: 1ª aproximação. Belém, 1972.p. 17-67. (IPEAN. Boletim Técnico, 54).

FARIAS, M.V. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solo de áreas preservadas em Roraima, Brasil.** 2008. 116 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Recursos Naturais) Universidade Federal de Roraima, Roraima,2008.

FELL, J.W., STATZELL-TALLMAN, A., KURTZMAN, C.P. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporegenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. **Studies in Mycology**,v. 50, p. 359–36, 2004.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCLRZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by largesubunitRdna D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic Evolution and Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1352-1371, 2000.

FORSTER, J.C. Soil sampling and storage, in **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Kassem, A. & Nannipieri, P., Eds. Elsevier Science, 1995.

FUENTEFRIA, A.M. **Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 144p.

GAVA, M.A. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizando na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos. 2002. 50p. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 2002.

GLASER, B. et al. The “Terra Preta” phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humic tropics. **Naturwissenschaften**, 2001, v. 88, p. 37-41, 2001.

GROSSMAN, J. M. et al. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 192- 205, 2010.

HONG, S.G.; LEE, K.H.; BAE, K.S. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. **The Journal of Microbiology**, v.40, n. 1, 2002.

JANISIEWICZ, W.; KURZTMAN, C. P. BUYER, J. S. Yeast associated with nectarines and their for biological control of brown rot. **Yeast**, Chichester, 2010 In press: Disponível em: <http://www.interscience.wiley.com>. Acesso em 2 de abril de 2010.

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

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. **Elsevier**, Amsterdam, 1998.

LACHANCE, M. Yeast Biodiversity: How many and much?. In: ROSA, C. A.; GÁBOR, P. (Eds). **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Berlim: Springer, v.1, p. 1-10, 2006.

LANDELL, M.F. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã – Viamão/RS**.2006. 136 f. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2006.

LANDELL, M.F. et al. Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã – RS. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 9, p. 55-67, 2005.

LEE, Y.J. et al. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. **Microbiology**, v.39, p. 33-39, 2011.

LEHMANN, J. et al. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and soils**. Netherland, v. 249, p. 343- 357, 2002.

LEHMANN, J. et al. Sequential fractionation and sources of P in Amazonian Dark Earths. In: GLASER, B.; WOODS, W.I (Org) **Amazonian Dark Earths: exploration in time and space**. Berlin: Springer, 2004. p. 113-123.

LEHMANN, J. et al. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C; GLASER, B.; WOODS, W. (Org). **Amazonian Dark Earths: origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003.p.105-124.

LIMA, H.N. **Gênese, química, mineralogia e micromorfologia de solos da Amazônia Ocidental.** 2001. 176 f.(Tese de Doutorado) - Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

LIMA, H.N. et al. Pedogenesis and pre-colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1-17, 2002.

LIMA, J.R. et al. Potencial de utilização de leveduras killer para produção de cachaça. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v.38, p. 366-371, 2007.

LIN, L., et al. The Actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v. 93, p. 1185-1195, 2012.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.66, p. 506-577, 2002.

M.C.C. CAMPOS, et al., Caracterização física e química de terras pretas arqueológicas e desolos não antropogênicos na região de Manicoré, Amazonas. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, p. 102-109, 2012.

MACFADDIN, J.P., LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MAGALHÃES, K.T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250, 2010.

MALDONADE, I.R.; CHERNOV, I. YU. Community structure of Yeast Fungi in Forest Biogeonoses. **Microbiology**, Reading, v. 73, p. 474-481, 2008.

MAUTONE, J.N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil.** 2008. 124 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2008.

MCMICHAEL, C. H. et al. Predicting pre-Columbian anthropogenic soils in Amazonia. **Royal Society Publishing**, Winston, n. 281, p. 1-9, 2014.

MESQUITA, A.A., MAGALHÃES, K.T., SILVA, C.F., SCHWAN, R.F. (2013). The Molecular Phylogenetic Diversity of Bacteria and Fungi Associated with the Cerrado Soil from Different Regions of Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Microbiological Research**. v.4, n.2, p.119-131, 2013.

MEYER SA, PAYNE RW, YARROW D (1998) *Candida* Berkhout. In 'The Yeasts, a Taxonomic Study'. (Eds CP Kurtzman, JW Fell) pp. 454-573. (Elsevier: Amsterdam)

MORAIS, P.B. et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugarcane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p. 241-243, 1997.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 626p.

MUKHERJEE, I., MITTAL, A. Bioremediation of Endosulfan Using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v.75, p.1034–1040, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Fourteenth Informational Supplement NCCLS documents M100-S14**. NCCLS, Wayne, Penn, 2004.

NAVARRETE, A.A. et al. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, Bethesda, v.2, p. 787-809, 2010.

O'NEILL, B. et al. Isolating unique bacteria from terra preta systems: using culturing and molecular tools for characterizing microbial life in terra preta. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE IN PHILADELPHIA, 2006, Philadelphia. Philadelphia: World Union of soil Sciences, 2006, p. 105.

OGUNTUNDE, P. G.; FOSU, M.; AJAYI, A. E.; GIESEN, N. van. Effects of charcoal production on maize yield, chemical properties and texture of soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 295-299, 2004.

PALUAN, S. F. **Construção de biblioteca metagenômica de DNA microbiano do solo amazônico e prospecção de enzimas de interesse biotecnológico**. 2011. 118 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

PAUL, N.C., Yu, S.H. Two Species of Endophytic *Cladosporium* in Pine Trees in Korea. **Mycobiology**, v.36, p. 211-216, 2008.

PAZINATO, J.M. **Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental**. 2007. 187 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PEIXOTO, R.S. et al. Decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.98, p. 403-413, 2010.

PEREIRA, G.V.M. A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacteria in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. **Microbiology Ecology**, v. 63, p. 405-417, 2011.

PEREIRA, V.J. et al. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. **Elsevier**, v.44, p. 4850-4859, 2010.

PHAFF, H. J.; STARMER, W.T. **Yeast** associated with plants, insects and soil. **The Yeast**, v.1, pp. 123-180, 1987.

QUIRINO, B. et al. (2009) Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v.164, p.59-70, 2009.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, France, 2000, v. 51, p. 167-166, 2000.

RAO, A.V., Bala, K. & Tarafdar, J.C. Dehydrogenase and phosphatase activities in soil as influenced by the growth of arid-land crops. **Journal of Agricultural Science**, v.115, p. 221-225, 1990.

RAO, M. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 597-634, 1998.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between Garden yeasts and microfungi pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, p. 331-342, 2009.

ROMERO, M. C.; REINOSO, E. H.; KIERNAN, A. M.; URRUTIA, M. I. Chlorinated biphenyl degradation by wild yeasts pre-cultured in biphasic systems. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.9, n.3, 2006

ROSA, L.H., MACHADO, K.M., JACOB, C.C., CAPELARI, M., ROSA, C.A. & ZANI, C.L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, p. 968–974, 2003.

RUGGIERO, P.G.C. et al. Soil-vegetation relationships in cerrado (Brazilian savanna) and semideciduous forest, Southeastern Brazil. **Plant Ecology**, v.160, p. 1-16, 2002.

SATOH, K.; MAKIMURA, K. K. *Sporobolomyceskoalae* sp. Nov., a basidiomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencer Woods, v. 58, p. 2983-2986, 2008.

SCHÄFER, J., JÄCKEL, U., KÄMPFER, P. (2010) Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.311, p. 103–112, 2010.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, Cambridge, v.2, p. 786-793, 2006.

SCHWAN, R. F. 'Yeast diversity in rice-cas-sava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil'. **FEMS Yeast Research**, Brasil, v. 7, p. 966-972, 2007.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; Siquera, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ufla, v. 1, p. 585-620, 2008.

SCHWARZENBACH, K., J.; ENKERLI, F. WIDMER. Objective criteria to assess representatively of soil fungal community profiles. *J. Microbiol. Methods*. v. 68, p. 358-366, 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHIN, K.S. *Candida Thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 2167–2170, 2001.

SILVA, M. G. G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico**. 2011. 187 f. Tese (Biologia na agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVA, M. S. et al. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* v.20, p.1-10,2013.

SILVA-FILHO, et al. A Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenock**, Amsterdam, v. 88, p. 13-23, 2006

SIVARAMAKRISHNAN, S. et al. α -Amylases from microbial sources –an overview on recent developments. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 173-184, 2006.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Effects of Pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v. 58, p. 855-859, 2000.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeast in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, 43, 430-436, 2003.

SMITH, N. J. H. Anthrosols and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association de American Geographers**, v. 70, p. 533-566, 1980.

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

SOMBROEK, W. et al. Amazonian dark earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B; WOODS, W.I. (Org). **Amazonian dark earths: origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publi., 2003. p. 125-139.

SOUZA, R.F. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2774-2778, 2008.

STEINBEISS, S.; GLEIXNER, G.; ANTONIETTI, M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1301-1310, 2009.

STRAUSS, M.L.A., et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, 91: 182-190, 2001.

TAKASHIMA, M.; NAKASE, T. *Tilletiopsis dextrii*, *Tilletiopsis oryzicola* and *Tilletiopsis penniseti*, three new species of the ustilaginomycetous anamorphic genus *Tilletiopsis* isolated from leaves in Thailand. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 80, p. 43-56, 2001.

THOMAS, D. S., DAVENPORT, R. R. *Zygosaccharomyces bailii* : a profile of characteristics and spoilage activities. **Food Microbiol**, v.2, p.157-169, 1985.

TORREZAN, R., EIROA, M.N.V., PFENNING, L. Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. **B. CEPPA**, v.18, p. 27-38, 2000.

TRINDADE, R.C. et al. Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, 25: 294-300, 2002.

TSAI, S.M. et al. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.; REBELLATO, L. (org). **Amazonian Dark Earth: wim sombroek's vision**. Berlin: Springer, 2009. p. 299-308.

VALE JUNIOR, J. F. et al. Solos da Amazônia: Etnopedologia e desenvolvimento sustentável. **Revista Agro@ambiente**, Boa Vista, UFRR, 2011, v. 5, n. 2, p.158-165, 2011.

VAZ, A.B.M. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v.55, p. 1381–1391, 2009.

VAZ, F. L. **Isolamento, purificação e caracterização de uma toxina killer de levedura isolada do caldo de cana-de-açúcar**. 2003. 42f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

VISHNIAC, H. S. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity Conservation**, London, v. 5, p. 1365-1378, 1996.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: na overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 329-350, 1993.

VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. M. Mycocinogenic yeast isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima – Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 230-235, 2003.

VOGEL, C.; ROGERSON, A.; SCHATZ, S.; LAUBACH, H.; TALLMAN, A.; FELL, J. Prevalence of yeast in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water Research**, Oxford, v. 42, p. 1915-1920, 2007.

WACHÉ, Y.; HUSSON, F.; FERON, F.; BELIN, G. Yeasts as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 49, p. 405-416, 2006.

WALLIS, P.D. et al. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Appl. Soil Ecol.** 46, 147-150, 2010.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Em **The Yeasts, a Taxonomic Study**, 4ª Edição, p. 77-100. Editado por C.P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier, 1998.

YURKOV, A.M; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Species Accumulation curves and incidence – based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. **Plos One**, v.6, n.8, 2011.

Apêndices

Apêndice A

Tabela 1- Características macromorfológicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica

Código da cepa	Cor da colônia	Brilho da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Forma da célula	Tamanho da colônia	Identificação molecular	Esporos sexuados	Formação de micélio
TPA 1001	creme	Opaca	lisa	cremosa	circular	média	(AIM ^{***})	ausente	ausente
TPA 1002	creme	Opaca	rugosa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1003	creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1004	creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1005	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1006	creme	opaca	lisa	mucoide	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1007	creme	opaca	lisa	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1008	creme	brilhosa	lisa	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1009	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	***	ausente	ausente
TPA 1010	creme	opaca	lisa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1011	branca	opaca	lisa	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1012	rosa escuro	opaca	lisa	cremosa	oval	grande	***	ausente	ausente
TPA 1013	esbranquiçada	opaca	rugosa	mucóide	circular	média	***	ausente	ausente

Tabela 1 – Continuação: características macromorfológicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1014	creme	Opaca	lisa	cremosa	alongada	grande	***	ausente	ausente
TPA 1015	creme	Brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1016	creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1017	creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1018	creme	brilhosa	lisa	mucoide	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1019	branca	opaca	lisa	mucoide	alongada	média	***	ausente	ausente
TPA 1020	amarelada	brilhosa	lisa	mucoide	circular	pequena	***	ascosporos	ausente
TPA 1021	creme	brilhosa	lisa	cremosa	rizoide	média	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1022	rosa escuro	opaca	rugosa	cremosa	circular	grande	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1023	branca	brilhosa	rugosa	cremosa	oval	pequena	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1024	branca	opaca	lisa	cremosa	circular	média	***	ascosporos	psseudohifas
TPA 1025	rosa claro	brilhosa	rugosa	cremosa	oval	média	***	ausente	ausente
TPA 1026	creme	opaca	rugosa	mucoide	rizoide	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1027	rosa escuro	opaca	rugosa	mucoide	puntiforme	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1028	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	***	ausente	ausente
TPA 1029	rosa claro	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1030	laranja/creme	brilhosa	lisa	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1031	branca	opaca	lisa	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1032	creme	Opaca	lisa	cremosa	alongada	pequena	***	ausente	pseudohifas
TPA 1033	creme	Brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente

TPA 1034	creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1035	rosa escuro	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1036	creme	opaca	irregular	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1037	branca	opaca	lisa	mucoide	alongada	média	***	ausente	ausente
TPA 1038	amarelada	opaca	estriada	mucoide	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1039	creme	opaca	lisa	cremosa	rizoide	grande	***	ausente	ausente
TPA 1040	creme	opaca	rugosa	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1041	branca	opaca	rugosa	cremosa	oval	grande	***	ausente	ausente
TPA 1042	branca	rugosa	lisa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1043	rosa claro	brilhosa	rugosa	cremosa	oval	grande	***	ausente	ausente
TPA 1044	creme	opaca	rugosa	mucoide	rizoide	média	***	ausente	ausente
TPA 1045	amarelada	brilhosa	rugosa	cremosa	puntiforme	média	***	ausente	ausente
TPA 1046	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1047	rosa claro	brilhosa	lisa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1048	laranja/creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1049	branca	opaca	estriada	mucoide	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1050	rosa claro	brilhosa	rugosa	rugosa	lenticular	média	***	ausente	pseudohifas
TPA 1051	rosa claro	Opaca	lisa	cremosa	alongada	grande	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1052	rosa escuro	Brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	***	ausente	pseudohifas
TPA 1053	amarelada	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	grande	***	ausente	pseudohifas
TPA 1054	rosa escuro	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	***	ausente	ausente

Tabela 1 – Continuação: características macromorfológicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1055	creme	opaca	irregular	mucoide	circular	pequena	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1056	branca	opaca	lisa	mucoide	alongada	média	***	ausente	ausente
TPA 1057	amarelada	opaca	lisa	mucoide	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1058	creme	opaca	lisa	cremosa	rizoide	grande	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1059	creme	opaca	lisa	cremosa	circular	média	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1060	creme	opaca	rugosa	cremosa	oval	grande	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1061	creme	rugosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1062	rosa claro	brilhosa	irregular	cremosa	rizoide	média	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1063	branca	opaca	irregular	mucoide	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1064	amarelada	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1065	laranja/creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	***	ausente	ausente
TPA 1066	rosa claro	brilhosa	lisa	cremosa	puntiforme	média	***	ausente	ausente
TPA 1067	laranja/creme	brilhosa	esriada	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1068	creme	opaca	estriada	mucoide	circular	grande	***	ausente	ausente
TPA 1069	creme	brilhosa	estriada	rugosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1070	creme	Opaca	lisa	cremosa	alongada	média	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1071	creme	Brilhosa	rugosa	cremosa	circular	média	***	ascosporos	pseudohifas
TPA 1072	creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1073	rosa escuro	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	média	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1074	creme	opaca	irregular	mucoide	circular	média	***	balistosporos	pseudohifas

Tabela 1 – Continuação: características macromorfológicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1075	branca	opaca	lisa	mucoide	alongada	grande	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1076	amarelada	opaca	estriada	mucoide	circular	média	***	balistosporos	pseudohifas
TPA 1077	creme	opaca	lisa	cremosa	rizoide	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1078	creme	opaca	rugosa	cremosa	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1079	branca	opaca	rugosa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1080	branca	rugosa	lisa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1081	rosa claro	brilhosa	rugosa	cremosa	oval	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1082	creme	opaca	rugosa	mucoide	rizoide	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1083	amarelada	brilhosa	rugosa	cremosa	puntiforme	média	***	ausente	ausente
TPA 1084	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	***	ausente	ausente
TPA 1085	rosa claro	brilhosa	lisa	cremosa	circular	grande	***	balistosporos	psedohifas
TPA 1086	laranja/creme	brilhosa	rugosa	cremosa	circular	pequena	***	ausente	ausente
TPA 1087	branca	opaca	estriada	mucoide	circular	média	***	ausente	ausente
TPA 1088	rosa claro	brilhosa	rugosa	rugosa	lenticular	grande	***	ascosporos	pseudohifas

(AIM^{***}) = Representa Aguardando Identificação Molecular

Apêndice B

Tabela 2 –Características fenotípicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

Código da cepa	Forma da célula	Tamanho da célula	Reprodução	Polaridade
TPA 1001	globosa	média	brotamento	unipolar
TPA 1002	globosa	pequena	brotamento	bipolar
TPA 1003	globosa	grande	fissão	unipolar
TPA 1004	apiculada	pequena	fissão	unipolar
TPA 1005	globosa	pequena	fissão	unipolar
TPA 1006	globosa	pequena	fissão	unipolar
TPA 1007	elipsoide	média	fissão	unipolar
TPA 1008	apiculada	média	fissão	bipolar
TPA 1009	triangular	grande	fissão	bipolar
TPA 1010	globosa	pequena	brotamento	multipolar
TPA 1011	elipsóide	média	brotamento	unipolar
TPA 1012	apiculada	grande	brotamento	unipolar
TPA 1013	cilíndrica	média	fissão	bipolar

Tabela 2 – Continuação: características fenotípicas dos isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1014	triangular	grande	brotamento	unipolar
TPA 1015	elipsóide	pequena	fissão	bipolar
TPA 1016	elipsóide	grande	fissão	bipolar
TPA 1017	elipsóide	pequena	fissão	unipolar
TPA 1018	globosa	pequena	fissão	unipolar
TPA 1019	globosa	média	fissão	unipolar
TPA 1020	elipsóide	pequena		
TPA 1021	apiculada	média		
TPA 1022	apiculada	grande		
TPA 1023	triangular	pequena		
TPA 1024	triangular	média		
TPA 1025	cilíndrica	média	brotamento	multipolar
TPA 1026	globosa	pequena	brotamento	unipolar
TPA 1027	triangular	pequena	brotamento	bipolar
TPA 1028	globosa	grande	fissão	bipolar
TPA 1029	apiculada	grande	fissão	unipolar
TPA 1030	elipsóide	média	fissão	unipolar
TPA 1031	talóide	média	fissão	unipolar
TPA 1032	talóide	pequena	brotamento	multipolar
TPA 1033	apiculada	pequena	brotamento	multipolar
TPA 1034	apiculada	pequena	fissão	unipolar
TPA 1035	triangular	média	brotamento	bipolar
TPA 1036	globosa	média	brotamento	bipolar
TPA 1037	globosa	média	fissão	bipolar
TPA 1038	elipsóide	pequena	fissão	unipolar
TPA 1039	triangular	grande	brotamento	unipolar
TPA 1040	triangular	média	brotamento	bipolar
TPA 1041	globosa	grande	brotamento	multipolar
TPA 1042	talóide	pequena	brotamento	multipolar
TPA 1043	talóide	grande	fissão	unipolar
TPA 1044	elipsóide	média	fissão	bipolar
TPA 1045	elipsóide	média	fissão	unipolar

TPA 1046	apiculada	pequena	fissão	multipolar
TPA 1047	apiculada	pequena	brotamento	unipolar
TPA 1048	globosa	pequena	fissão	bipolar
TPA 1049	triangular	grande	fissão	unipolar
TPA 1050	cilíndrica	média	fissão	unipolar
TPA 1051	elipsóide	grande		
TPA 1052	talóide	grande	fissão	bipolar
TPA 1053	apiculada	grande	rugosa	cremosa
TPA 1054	globosa	grande	lisa	cremosa
TPA 1055	globosa	pequena		
TPA 1056	globosa	média	brotamento	
TPA 1057	globosa	pequena	brotamento	
TPA 1058	globosa	grande		
TPA 1059	triangular	média		
TPA 1060	triangular	grande		
TPA 1061	elipsóide	pequena		
TPA 1062	elipsóide	média		
TPA 1063	elipsóide	grande	fissão	unipolar
TPA 1064	globosa	pequena	brotamento	unipolar
TPA 1065	triangular	média	brotamento	bipolar
TPA 1066	cilíndrica	média	brotamento	unipolar
TPA 1067	elipsóide	média	brotamento	bipolar
TPA 1068	elipsóide	grande	brotamento	unipolar
TPA 1069	cilíndrica	pequena	brotamento	unipolar
TPA 1070	cilíndrica	média		
TPA 1071	talóide	média		
TPA 1072	globosa	média	brotamento	multipolar
TPA 1073	globosa	média		
TPA 1074	globosa	média		
TPA 1075	apiculada	grande		
	apiculada	média		

TPA 1076	elipsóide	pequena	fissão	cremosa
TPA 1077	elipsóide	média	fissão	cremosa
TPA 1078	elipsóide	pequena	fissão	cremosa
TPA 1079	triangular	pequena	fissão	cremosa
TPA 1080	talóide	pequena	fissão	cremosa
TPA 1081	talóide	pequena	fissão	mucoide
TPA 1082	globosa	média	brotamento	cremosa
TPA 1083	triangular	média	brotamento	cremosa
TPA 1084	triangular	grande		
TPA 1085	talóide	pequena	brotamento	cremosa
TPA 1086	talóide	média	fissão	mucoide
TPA 1087	talóide	grande		
TPA 1088				

Apêndice C

Tabela 3- Perfil enzimático e teste para fenótipo *killer* de isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica

Código da cepa	Amilase	Esterase	Celobiase	Gelatinase	Caseinase	Fenótipo <i>killer</i>
TPA 1001	-	W	++	-	++	+
TPA 1002	-	-	++	-	++	-
TPA 1003	++	-	++	-	++	+
TPA 1004	-	W	++	-	++	-
TPA 1005	-	-	++	-	++	+
TPA 1006	-	-	++	++	++	+
TPA 1007	-	-	++	-	++	-
TPA 1008	++	++	W	-	++	-
TPA 1009	-	++	-	++	++	-
TPA 1010	-	++	++	-	-	+
TPA 1011	++	++	-	-	-	+
TPA 1012	-	++	-	++	-	-
TPA 1013	++	-	++	-	++	+

Tabela 3 – Continuação: perfil enzimático e teste para fenótipo *killer* de isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1014	-	-	++	++	-	+
TPA 1015	-	-	++	-	-	+
TPA 1016	-	-	++	++	-	-
TPA 1017	-	-	++	++	-	-
TPA 1018	-	-	++	++	-	+
TPA 1019	-	-	++	++	-	-
TPA 1020	-	-	++	-	-	-
TPA 1021	-	++	-	-	++	-
TPA 1022	++	++	-	-	-	-
TPA 1023	++	-	++	-	-	-
TPA 1024	++	++	-	-	-	-
TPA 1025	-	++	-	-	-	+
TPA 1026	-	++	+	-	-	+
TPA 1027	-	++	+	-	-	-
TPA 1028	-	++	++	-	-	-
TPA 1029	-	++	++	-	-	+
TPA 1030	++	-	++	-	-	+
TPA 1031	-	++	++	-	-	+
TPA 1032	-	++	-	-	-	-
TPA 1033	-	++	-	-	-	+
TPA 1034	++	-	++	-	-	+
TPA 1035	-	-	++	-	-	-
TPA 1036	-	++	-	-	-	+
TPA 1037	-	++	++	-	-	-
TPA 1038	-	++	-	-	-	-
TPA 1039	-	-	++	-	-	-
TPA 1040	-	-	++	-	-	-
TPA 1041	-	-	++	-	-	+
TPA 1042	-	-	++	-	-	+
TPA 1043	-	W	++	-	-	-
TPA 1044	-	++	-	-	-	-
TPA 1045	++	++	-	-	-	-

Tabela 3 – Continuação: perfil enzimático e teste para fenótipo *killer* de isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1046	-	-	++	-	-	-
TPA 1047	-	-	++	-	-	-
TPA 1048	-	-	++	-	-	-
TPA 1049	-	-	++	-	-	-
TPA 1050	-	-	++	-	-	-
TPA 1051	-	-	++	-	-	-
TPA 1052	-	++	-	-	-	-
TPA 1053	-	++	++	-	-	-
TPA 1054	-	++	-	-	-	-
TPA 1055	-	-	++	-	-	-
TPA 1056	-	-	++	-	-	-
TPA 1057	-	-	++	-	-	-
TPA 1058	++	-	++	-	-	-
TPA 1059	-	++	-	-	-	-
TPA 1060	-	++	-	-	-	-
TPA 1061	-	-	++	-	-	-
TPA 1062	-	-	++	-	-	-
TPA 1063	-	-	++	++	-	+
TPA 1064	-	-	++	++	-	-
TPA 1065	-	-	++	++	-	-
TPA 1066	-	-	++	-	-	+
TPA 1067	-	-	++	-	-	-
TPA 1068	-	-	++	-	-	-
TPA 1069	-	-	++	-	-	-
TPA 1070	-	++	W	-	++	-
TPA 1071	-	++	-	-	++	-
TPA 1072	-	++	++	-	++	-
TPA 1073	-	-	++	-	++	-
TPA 1074	-	-	++	-	++	-

Tabela 3 – Continuação: perfil enzimático e teste para fenótipo *killer* de isolados leveduriformes de Terra Preta Antropogênica.

TPA 1075	-	++	-	-	++	-
TPA 1076	-	++	++	-	++	-
TPA 1077	-	-	++	-	++	-
TPA 1078	-	++	++	-	++	-
TPA 1079	-	++	-	-	-	-
TPA 1080	-	++	-	-	-	-
TPA 1081	++	-	++	-	-	-
TPA 1082	-	-	++	-	-	-
TPA 1083	-	-	++	++	-	-
TPA 1084	-	-	++	-	++	-
TPA 1085	-	++	+	-	++	-
TPA 1086	-	++	+	-	-	-
TPA 1087	-	++	-	-	-	-
TPA 1088	++	-	++	-	-	-

Apêndice D

$$\Delta \text{pH} = \text{pH KCl} - \text{pH H}_2\text{O} = 6,2 - 5,2 = +1$$

Solo com predominância de cargas positivas

pH (H₂O) = 6,2 – moderadamente ácido

pH (KCl) = 5,2 – fortemente ácido

Soma de Bases (**SB**) = 9,16 cmole/dm³

$$\mathbf{SB} = \text{Ca} + \text{Mg} + \text{K} + \text{Na} = 9,16 \text{ cmole/dm}^3$$

Percentagem de Saturação por Bases (V) = 69,41%

- usado para recomendação de calagem

V < 50 % - Solos Eutróficos – considerado fértil

V > 50 % - Solos Distróficos – considerado menos fértil

P = 511,28 mg/dm³ – Alto índice

$$\text{meq/100cm}^3 = 10 \text{ cmole/} = 1 \text{ cmole/dm}^3$$

K = 24 mg/dm³ – Alto índice

$$\text{cmole k/dm}^3 = \text{ppm k} \div 390$$

Ca + Mg = 9,1 cmole/dm³ = meq/100cm³

$$\text{cmole k/dm}^3 = 24 \div$$

Al = 0,1 cmole/dm³ = Baixo índice

$$\text{cmole k/dm}^3 = 0,062$$

Ca = 7,1 cmole/dm³ = Alto índice

Mg = 2,0 cmole/dm³ = Alto índice

Saturação por Alumínio (**m**) = 1,08

$$m = 0,1 \times 100 / 9,26 = 1,08 \%$$

m = 0 – 15% Baixo (não prejudicial)

Matéria Orgânica = 3,84 dag/kg --- classificação – 2,01 – 4 = Médio

Acidez Potencial (H + Al) = 4,04 (2,51 – 5,0) – classificação = Médio

Cálculos com a CTC (T) do solo de TPA

CTC (T) do solo = 13,20 cmole/dm³

SB = 9,16 cmole/dm³

CTC a pH 7 ou total (T) ---

T = SB + H + Al T = 9,16 + 4,04 = 13,02 Classificação 8,61 - < 5 cmole/dm³ ---- Bom

CTC efetiva (t)

$$t = SB + Al$$

$$t = 9,16 + 0,1$$

$$t = 9,26 \text{ cmole/dm}^3 > 8$$

Classificação 8 cmole/dm³ --- Muito bom

Saturação de Bases (V%)

$$V = SB \times 100 / SB + (H+Al) = 9,16 \times 100 / 9,16 + 4,04 \quad V = 69,4 \%$$

Classificação

$$Zn = 6,42 \text{ mg/dm}^3 \text{ -----} > 1,6 \text{ Alto teor}$$

$$Mn = 24,43 \text{ mg/dm}^3 \text{ -----} > 5,0 \text{ Alto teor}$$

Apêndice D

Quadro 1 – Resultados analíticos da amostra de solo de Terra Preta Antropogênica

pH (KCl)	pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al				
		mg/dm ³			--cmol/dm ³ --							
5,2	6,2	24,00	511,28	-	7,10	2,00	0,10	4,04				
Ataque Sulfúrico												
SB	t	T	V	m	M.O	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
cmolc/dm ³		%		dag/kg	mg/L	mg/dm ³						
9,16	9,26	13,20	69,41	1,08	3,84	24,34	6,42	23,57	24,43	-	-	-
Ataque Sulfúrico												
%SiO ₂	%Al ₂ O ₃	%Fe ₂ O ₃	%TiO ₂	%P ₂ O ₅	Ki	Kr	Al ₂ O ₃ /Fe ₂ O ₃					
4,75	7,48	1,52	0,617	0,588	1,08	0,96	7,74					

Legenda: potássio (K), fósforo (P), alumínio (Al), magnésio (Mg), matéria orgânica (M.O), pH, hidrogênio + alumínio (H + Al), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), níquel (Ni), arsênio (As), cádmio (Cd), lead (Pb), sódio (Na) e mercúrio (Hg), SB – (saturação de bases).

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

Ca - Mg- Al- Extrator: KCl - 1 mol/L

SB= Soma de Bases Trocáveis

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m= Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo Remanescente

S - Extrator - Fosfato monocalcário em ácido acético

Apêndice E

Norma técnica utilizada nesta dissertação : *Furasté*; Normas Técnicas para o Trabalho Científico. ABNT 2014. 17ª edição. Revisada e atualizada.

