

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LUIS FERNANDO MERLOTI

Efeito do uso do solo ao longo do tempo em comunidades microbianas
do ciclo do nitrogênio em solos tropicais

Piracicaba
2018

LUIS FERNANDO MERLOTI

Efeito do uso do solo ao longo do tempo em comunidades microbianas
do ciclo do N em solos tropicais

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6011 de 2018

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura
e no Ambiente

Orientador: Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai

Piracicaba
2018

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Merloti, Luis Fernando

Efeito do uso do solo ao longo do tempo em comunidades microbianas do ciclo do N em solos tropicais / Luis Fernando Merloti; Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2018.
82 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Amplificação do DNA 2. Ciclo do nitrogênio 3. Dados de sequência molecular 4. Ecologia microbiana 5. Genética microbiana 6. Nitrificação 7. Reação em cadeia por polimerase 8. Uso do solo I. Título.

CDU 631.153.7 : 579.266.2

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça de mais uma etapa vencida. Assim, junto a você, tudo é bem mais fácil. Tudo é bem mais belo.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Tsai Siu Mui, pelas oportunidades e pela confiança. Um exemplo que trabalho duro, determinação, luta e conquistas!

Aos meus pais Aparecida, Luiz e demais familiares pelo apoio e por estarem sempre comigo apesar da distância.

Um enorme agradecimento ao Me. Leandro Fonseca de Souza e ao Dr. Lucas William Mendes, Me. Siglea e ao Prof. Dr. Plíneo Carmargo pela ajuda na coleta e elaboração deste trabalho.

Aos amigos, funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e agregados: Acácio, Alexandre, Aline, Andressa, Bia, Clóvis, Caio, Dasiel, Fabi, Fernanda, Elisa, Eduardo Mariano, Julia Brandão, Leandro Lemos, Kelly, Miriam, Marcos, Fábio, Wagner, Renata, Lucas Vinícius, Raissa Andrade, Mayara Martins, M. Rodrigues, Carina Oliveira, Tayná e demais companheiros de pós-graduação.

Aos amigos adamantinenses Alessandra, Edmar Bortoletto, Débora, Gustavo, Guilherme, Felipe e José pela amizade de mais de 10 anos!

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado e todos os seus funcionários.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2014/50320-4), pelos auxílios e bolsas concedidas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MERLOTI, L. F. **Efeito do uso do solo ao longo do tempo em comunidades microbianas do ciclo do nitrogênio em solos tropicais**. 2018. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Os micro-organismos possuem funções essenciais para a manutenção da vida no planeta atuando em processos biogeoquímicos, como o ciclo do N. A fixação biológica de N, nitrificação e desnitrificação são processos responsáveis por controlar o fluxo de entrada e saída do N na biosfera e são mediados pela microbiota do solo. A Floresta Amazônica, considerada um dos maiores reservatórios de biodiversidade do planeta, vem sendo desmatada e convertida em áreas de exploração agropecuária. Essas mudanças são responsáveis por modificações nas propriedades químicas do solo e conseqüentemente alteram a microbiota presente nesses ambientes. No entanto, o impacto dessas alterações ao longo do tempo ainda permanece pouco esclarecida, principalmente em ambientes tropicais. Com base na hipótese de que micro-organismos relacionados ao ciclo do N em solos tropicais são influenciados pelo uso do solo ao longo do tempo, o presente estudo teve como objetivo avaliar parâmetros do solo, abundância de genes marcadores relacionados ao ciclo do N e composição taxonômica de *Bacteria* e *Archaea* em solos com diferentes idades de uso da terra, rizosfera e solo de floresta primária da região amazônica. Os solos foram coletados em três áreas de agricultura, com 2, 5 e 20 anos de uso do solo e uma floresta primária, localizados na Mesorregião do Baixo Amazonas, próximos ao município de Belterra-PA. Um experimento em mesocosmo também foi realizado, para avaliação da microbiota presente na rizosfera de plantas de soja. Os solos coletados foram caracterizados quimicamente e, à partir do DNA total extraído das amostras, foram realizadas análises de quantificação dos genes marcadores filogenéticos *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*; dos genes funcionais *nifH*, *AOA*, *AOB*, *nirK* e *nirS*; e sequenciamento em larga escala de *amplicons* dos genes *16S rRNA* de *Archaea* e *Bacteria*. A floresta primária apresentou solo com maior acidez e menor disponibilidade de nutrientes, quando comparada com os solos de agricultura e rizosfera. De modo geral, os filos bacterianos que apresentaram maior abundância relativa foram Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi (com 24, 22, 14 e 12% respectivamente). As bactérias do solo de floresta apresentaram uma menor diversidade (Índice de Shannon e Chao, $P < 0,05$) e diferente composição dos verificados em solos de agricultura e rizosfera. As comunidades de arqueias verificadas em solo de floresta apresentaram maior diversidade em relação aos

demais ambientes (Índice de Shannon, $P < 0,05$), e foi observado uma maior abundância relativa do filo Thaumarchaeota em todos os solos avaliados (>98%). O solo sob uso agrícola de 2 anos apresentou maior número de cópias por grama de solo dos genes *16S rRNA* de *Bacteria* ($5,11 \times 10^{10}$) e *Archaea* ($1,53 \times 10^8$) ($P < 0,05$). O gene *amoA* de *Bacteria* apresentou maior abundância em solos de agricultura (*bulk soil*) ($P < 0,01$) e correlacionou-se positivamente com bases trocáveis do solo, enquanto que o gene *amoA* de *Archaea* apresentou maior abundância em solos rizosféricos ($P < 0,01$) e correlacionou-se negativamente com o N disponível no solo. Os resultados sugerem que em solos amazônicos a oxidação da amônia é conduzida predominantemente por *Archaea*. Conclui-se que o uso do solo ao longo do tempo influenciou a abundância de micro-organismos, enquanto que a mudança de uso do solo alterou a composição microbiana em solos amazônicos.

Palavras-chave: Uso do solo. Diversidade microbiana. Nitrificação. Oxidantes de amônia. Sequenciamento de amplicon.

ABSTRACT

MERLOTI, L. F. **Effect of soil use over time on nitrogen cycle microbial communities in tropical soils**. 2018. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Centro de Energia Nuclear na Agricultura), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Microorganisms have essential functions for maintenance of life on planet, acting in biogeochemical processes, such as N cycle. The biological N fixation, nitrification and denitrification are processes responsible for controlling the flux of input and output of N in biosphere and are mediated by the soil microbiota. The Amazon rainforest, considered one of the largest biodiversity reservoirs on planet, has been deforested and converted to agricultural lands bringing changes in soil properties and consequently in microorganisms that inhabit these environments. However, the impact of these long-term changes remains unclear, mainly on tropical soils. Based on the hypothesis that N-cycle-related microorganisms in tropical soils are influenced by long-term land use, the aim of this study was to evaluate chemical soil parameters, the abundance of marker genes related to the N cycle and taxonomic *Bacteria* and *Archaea* composition in soils with different land use ages, rhizosphere and primary forest soil of Amazon region. The soils were collected in three agriculture areas, with 2, 5 and 20 years of land use and a primary forest, located in the Lower Amazonas Meso-region, near the city of Besterra-PA. A mesocosm experiment was also carried out to evaluate the microbiota present in rhizosphere of soybean plants. The sampled soils were chemically characterized and, with DNA extracted from the samples, was carried out quantification analyzes of *16S rRNA* phylogenetic marker genes of *Bacteria* and *Archaea*; functional genes *nifH*, *AOA*, *AOB*, *nirK* and *nirS*; and sequencing of amplicons of *16S rRNA* genes of *Archaea* and *Bacteria*. The primary forest presented soil with higher acidity and lower availability of nutrients when compared with land soils and rhizosphere. In general, the most abundant bacterial phylum were Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria and Chloroflexi (24, 22, 14 and 12% respectively). *Bacteria* of forest soil presented a lower diversity and different composition of those verified in land soils and rhizosphere (Shannon and Chao index, $P < 0,05$). *Archaea* communities verified in forest soil presented greater diversity in relation to others environments (Shannon Index, $P < 0,05$), and a greater relative abundance of the Thaumarchaeota phylum was observed in all evaluated soils ($> 98\%$). The land soil with 2 years had the highest number of copies per gram of soil of *16S rRNA* genes of *Bacteria* ($5,11 \times 10^{10}$) and *Archaea* ($1,53 \times 10^8$) ($P < 0,05$). *Bacteria amoA* gene showed greater

abundance in bulk soil ($P < 0,01$) and correlated positively with soil exchangeable bases, while the *Archaea amoA* gene showed greater abundance in rhizospheric soils ($P < 0,01$) and correlated negatively with the available N. *Bacteria amoA* gene showed greater abundance in bulk soil ($P < 0,01$) and correlated positively with soil exchangeable bases, while the *Archaea amoA* gene showed greater abundance in rhizospheric soils ($P < 0,01$) and correlated negatively with the available N. The results suggest that in Amazon soils the ammonia oxidation is predominantly driven by *Archaea*. In conclusion, the land use over time influenced the abundance of microorganisms while the land use change altered the microbial composition in Amazonian soils.

Keywords: Long-term land use. Microbial diversity. Nitrification. Ammonia oxidizers. Amplicon sequencing.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 A importância dos micro-organismos do solo..... | 15 |
| 2.2 Micro-organismos e sua relação com os ciclos biogeoquímicos..... | 15 |
| 2.3 O ciclo do N em sistemas agrícolas | 19 |
| 2.4 Fixação Biológica de N..... | 20 |
| 2.5 Nitrificação no solo | 22 |
| 2.5.1 Ecologia dos micro-organismos nitrificantes: Nitritação | 22 |
| 2.5.1 Ecologia dos micro-organismos nitrificantes: Nitratação | 23 |
| 2.6 Desnitrificação | 24 |
| 2.7 Etapas alternativas do ciclo do N | 26 |
| 2.8 As entradas de C no solo | 26 |
| 2.9 O ambiente rizosférico | 26 |
| 2.10 A mudança de uso do solo na região Amazônica..... | 28 |
| 2.11 Técnicas moleculares no estudo de micro-organismos do solo..... | 29 |
| 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Hipótese..... | 32 |
| 3.2 Objetivo..... | 32 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Caracterização das áreas de estudo | 33 |
| 4.1.1 Áreas de agricultura | 33 |
| 4.1.2 Floresta nativa | 34 |
| 4.2 Amostragem | 34 |
| 4.3 Coleta e processamento das amostras de solo | 35 |
| 4.4 Experimento em mesocosmo | 36 |
| 4.5 Análises físico-químicas das amostras de solo..... | 36 |
| 4.6 Extração de DNA do solo..... | 37 |
| 4.7 PCR quantitativo em tempo-real | 37 |
| 4.8 Sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> | 38 |
| 4.9 Análise dos dados..... | 39 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 5.1 Propriedades químicas dos solos analisados | 41 |
| 5.1.1 Comparação entre áreas de floresta primária e agricultura sob uso do solo ao longo do tempo.. | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.1.2 | Comparações entre rizosferas sob uso do solo ao longo do tempo | 42 |
| 5.1.3 | Interação entre solos de agricultura e rizosfera sob uso do solo ao longo do tempo | 43 |
| 5.2 | Sequenciamento em larga escala | 45 |
| 5.2.1 | Análise da estrutura e diversidade de <i>Bacteria</i> | 45 |
| 5.2.2 | Composição das comunidades de <i>Bacteria</i> | 47 |
| 5.2.3 | Análise da estrutura e diversidade de <i>Archaea</i> | 51 |
| 5.2.4 | Composição das comunidades de <i>Archaea</i> | 53 |
| 5.3 | Abundância de genes relacionados ao ciclo do N | 54 |
| 5.3.1 | Correlação entre parâmetros químicos do solo e qPCR | 58 |
| 5.3.2 | Análise de Redundância (RDA) | 60 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 64 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR | 78 |

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) tem grande importância para a manutenção da biosfera do planeta. O elemento faz parte de 78% da composição química atmosférica da Terra, além de compor biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos que fazem do elemento essencial para a continuidade da vida no planeta (NASA, 2016; DIAS, 2016). Processos como a fixação biológica de N (FBN), nitrificação e desnitrificação compõem o ciclo do N e são responsáveis por controlar o fluxo de entrada e saída do elemento na biosfera. Cada uma das etapas do ciclo do N ocorre através de reações de oxidação e redução que são em sua maioria mediadas por micro-organismos (DIAS, 2016).

A microbiota do solo é responsável por grande parte das transformações do N na biosfera, além de regular outros ciclos como o C (carbono), P (fósforo) e S (enxofre) (PAUL, 2014). Os micro-organismos do solo possuem uma grande biodiversidade e tem funções que estão intimamente ligadas com a manutenção da vida no planeta, como a associação com ciclos biogeoquímicos, ciclagem de nutrientes, decomposição, desenvolvimento de plantas e outros organismos, qualidade do solo, entre outras funções (ARIAS et al., 2005; ZELLER et al., 2008; HERMAN et al., 2012).

A ação humana vem alterando de forma intensa a biogeoquímica do planeta, refletindo em alterações na estabilidade climática natural da Terra. O intenso uso de combustíveis fósseis, queimadas, mudança de uso do solo e o excessivo uso de fertilizantes são exemplos de alterações antropogênicas responsáveis pelas alterações observadas no planeta. O desequilíbrio do ciclo do N promove a intensificação da produção de gases de efeito estufa, como o N₂O (óxido nitroso), além da contaminação aquática através da lixiviação do elemento para corpos d'água (IPCC, 2013; PUCKETT; TESORIERO; DUBROVSKY, 2010).

A região amazônica, considerada um dos maiores reservatórios de biodiversidade do planeta é alvo de intensos desmatamentos, onde a Floresta que cobre naturalmente o solo é derrubada, queimada e convertida em áreas de exploração agropecuária, como o cultivo pastagens e áreas de produção de soja (HECKENBERGER et al., 2007; ALMEIDA et al., 2016).

Sabe-se que micro-organismos do solo são alterados através de ações antropogênicas, respondendo a modificações nas propriedades físicas, químicas e biológicas no solo (NAVARRETE et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016). Os mesmo autores verificaram que a comunidade microbiana do solo é alterada com a mudança de uso da terra, o que consequentemente reflete nas funções e processos que tais micro-organismos desempenham no solo. No entanto, o impacto dessas alterações a longo prazo na microbiota do solo ainda permanece pouco esclarecida.

Nesse sentido, o estudo da comunidade de micro-organismos do solo pode ajudar a elucidar o impacto da conversão de florestas em áreas de exploração agrícola e o efeito desse uso do solo ao longo do tempo em micro-organismos correlatados com o ciclo do N, auxiliando a busca por manejos mais sustentáveis que evitem a perda do elemento no ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância dos micro-organismos do solo

Quando pensamos em micro-organismos, o termo abrange uma série de indivíduos, que não podem ser vistos a olho nu, exceto com o auxílio de ferramentas como o microscópio. O pequeno tamanho dessas formas de vida dificultou sua compressão e estudos ao longo dos séculos. Entretanto, o avanço das tecnologias no estudo do DNA e microbiologia permitiu a classificação da microbiota como pertencentes aos três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (WOESE, 1990).

Os micro-organismos estão presentes nos mais variados ambientes em nosso planeta e são capazes de sobreviver em condições ambientais extremas como, por exemplo, no fundo de oceanos, fontes termais e até mesmo cavernas vulcânicas (JIANG; JIAO, 2016; McCLIMENT et al., 2006; HATHAWAY et al., 2014). Os micro-organismos podem ainda viver dentro de outros organismos como, por exemplo, o intestino de mamíferos e insetos (ECKBURG et al., 2005; DILLON; DILLON, 2004), em associação com plantas através de nódulos (JONES et al., 2007) ou ainda em superfícies de raízes e no próprio solo (TATE, 2017).

As atividades dos micro-organismos são especialmente diversas e importantes. Degradação de pesticidas, produção de toxinas, decomposição de celulose, intemperização de rochas e minérios, formação de depósitos sulfurosos, produção de antibióticos são exemplos de muitos processos de significância ecológica e geoquímica que são mediados por micro-organismos (JACOBSON et al., 2000). Funções como a ciclagem de nutrientes (ZELLER et al., 2008), decomposição da matéria orgânica (HERMAN et al., 2012), associação com ciclos biogeoquímicos, manutenção da qualidade do solo, desenvolvimento de plantas (ARIAS et al., 2005) são exemplos da interação dos micro-organismos do solo com a biosfera.

As comunidades microbianas do solo possuem diferentes tipos de fisiologia e complexas estratégias de sobrevivência permitindo sua adaptação no ambiente em que vivem, como resultado dessas interações, muitos aspectos dos ciclos biogeoquímicos necessários para a vida terrestre são mediados por atividades microbianas (PAUL, 2014).

2.2 Micro-organismos e sua relação com os ciclos biogeoquímicos

Ciclo biogeoquímico pode ser definido como a movimentação e transformação de elementos como N, C, P, S entre outros, nas diferentes geosferas do planeta Terra, promovendo a sua constantemente ciclagem no ambiente. As geosferas do nosso planeta são representadas pela atmosfera, hidrosfera, pedosfera, litosfera e principalmente a biosfera que

abrange todas as formas de vida do planeta, incluindo os micro-organismos (JACOBSON et al., 2000).

O termo “ciclo biogeoquímico” relaciona os papéis entrelaçados de componentes bióticos e abióticos para fornecer moléculas necessárias para o crescimento e reprodução de organismos. Ao longo da evolução, micro-organismos pertencentes aos três domínios da vida desenvolveram maquinarias necessárias para reciclar quase todas as moléculas complexas utilizadas na nutrição de organismos superiores. Considerando que o processo de decomposição resulta na reciclagem simultânea de diferentes elementos, os ciclos do C, N e P são exemplos de atividades microbianas em ambientes terrestres, aquáticos e atmosféricos (PAUL, 2014).

No ciclo do N, as comunidades microbianas são responsáveis por diversas transformações do elemento em nossa atmosfera, afetando desde a produção primária de plantas até a emissão de gases responsáveis pela mudança climática (LIKENS; BORMANN; JOHNSON, 1981). A biogeoquímica do N é quase inteiramente dependente de reações de oxidação e redução que em sua maioria são mediadas por micro-organismos (FALKOWSKI, 1997; CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010). O fluxo natural de N no planeta é principalmente conduzido por processos como a FBN, responsável pela conversão de N atmosférico em amônia (NH_3^+); mineralização de N para formas orgânicas (amonificação + nitrificação); transformações gasosas como a desnitrificação e volatilização (PAUL, 2014).

De forma geral, os micro-organismos também fazem parte da regulação de C entre o solo e a atmosfera. A fotossíntese é uma das principais vias de fixação de C atmosférico, porém é através de processos como a decomposição, respiração aeróbia e autotrófica que micro-organismos do solo atuam de forma mais intensiva no ciclo do C (PAUL, 2014).

Existem também transformações microbianas do P no solo, como o processo de solubilização. O P não-lábil (adsorvido em colóides do solo) é disponibilizado para a solução do solo pela ação microbiana. Os micro-organismos solubilizadores são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos e prótons que atuam dissolvendo diretamente o material fosfatado ou quelando os cátions (Ca, Mg, Fe, Al, Mn e Zn) que acompanham o ânion fosfato, liberando esses elementos para posterior absorção por micro-organismo ou plantas (RICHARDSON et al., 2001; HU et al., 2009; LOPEZ; BINI; LOURENÇO, 2016). De modo geral, a microbiota do solo tem suma importância para a ciclagem do P em ecossistemas, seja através da oxidação da matéria orgânica ou pela solubilização do fosfato (LOPEZ; BINI; LOURENÇO, 2016).

O ciclo do S também sofre uma série de transformações biogeoquímicas mediadas por micro-organismos no solo resultando na ciclagem do nutriente. O elemento tem grande importância na natureza, participando da constituição de aminoácidos, vitaminas, hormônios e coenzimas e possui uma ampla variação de estados de oxidação e redução. De forma geral, o ciclo do S no solo pode ser dividido em processos de redução, oxidação e mineralização/imobilização, todos mediados por micro-organismos (LOPEZ; BINI; LOURENÇO, 2016).

Vale ressaltar que a ação humana nos últimos séculos vem alterando de forma intensa os ciclos biogeoquímicos. Essas ações antropogênicas são refletidas através de alterações da temperatura, umidade e instabilidade climática do planeta. O intenso uso de combustíveis fósseis, queimadas, mudança de uso do solo e a aplicação exagerada de fertilizantes são exemplos de ações antropogênicas responsáveis por alterar os ciclos biogeoquímicos, que consequentemente refletem no funcionamento desses micro-organismos e seu papel no ambiente (de VRIES; SHADE, 2013; PROSSER; NICOL, 2012; PAJARES; BOHANNAN; SOUZA, 2016).

A Tabela 1 representa de forma resumida, processos de oxidações e reduções mediados por grupos de organismos em diferentes ciclos biogeoquímicos.

Tabela 1 - Ciclos biogeoquímicos do C, N, P e S importantes transformações mediadas por micro-organismos

| Ciclo | Processo (Transformação química) | Grupo biológico responsável |
|----------------|---|---|
| Carbono (C) | <ul style="list-style-type: none"> • Fixação de dióxido de carbono ($\text{CO}_2 \rightarrow$ matéria orgânica) | <ul style="list-style-type: none"> • Organismos fotossintéticos: plantas, algas e bactérias. |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Respiração aeróbica (matéria orgânica + $\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) • Mineralização (matéria orgânica + $\text{O}_2 \rightarrow$ material inorgânico) | <ul style="list-style-type: none"> • Organismos quimioautotróficos: bactérias nitrificantes, oxidantes de enxofre, ferro e hidrogênio. • Micro-organismos, principalmente fungos e bactérias. |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Produção de metano [$\text{CO}_2 + \text{H}_2$ (ou compostos orgânicos simples como o acetato) $\rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2$] | <ul style="list-style-type: none"> • Arqueias produtoras de metano. |
| Nitrogênio (N) | <ul style="list-style-type: none"> • Fixação de nitrogênio ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$) | <ul style="list-style-type: none"> • Bactérias diazotróficas de vida livre e simbiontes (<i>Actinobacteria</i>, <i>Clostridia</i>, <i>Cianobacteria</i> e <i>Proteobacteria</i>). |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Nitrificação ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) | <ul style="list-style-type: none"> • Bactérias oxidantes de amônia (AOB) e arqueias oxidantes de amônia (AOA). |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Desnitrificação dissimilatória^a ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2, \text{N}_2\text{O}$) | <ul style="list-style-type: none"> • Bactérias, arqueias e alguns eucariotos. |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Amonificação (N-Orgânico $\rightarrow \text{NH}_3$) | <ul style="list-style-type: none"> • Muitos micro-organismos, incluindo bactérias. |
| Fósforo (P) | <ul style="list-style-type: none"> • Solubilização do fosfato | <ul style="list-style-type: none"> • Algumas bactérias como <i>Pseudomonas</i>, <i>Bacillus</i>; Fungos como <i>Arpegillus</i> e <i>Penicillium</i>. |
| Enxofre (S) | <ul style="list-style-type: none"> • Oxidação do enxofre ($\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$) | <ul style="list-style-type: none"> • Bactérias e cianobactérias; Oxidantes de sulfato quimioautotróficos. |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Redução dissimilatória do sulfato^b ($\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$) | <ul style="list-style-type: none"> • Bactérias redutoras de sulfato. |

^a - Desnitrificação assimilatória reduz nitrato para o nível de aminoácidos que são incorporados em proteínas. Muitas plantas e bactérias podem executar essa função utilizando o nitrato como fonte de N.

^b - Redução dissimilatória do sulfato reduz sulfato para o nível sulfidril, que é incorporada em aminoácidos de enxofre de proteínas. Muitas plantas e bactérias podem executar essa função.

(Adaptado de JACOBSON et al., 2000; SHARMA et al., 2013; DIAS, 2016)

2.3 O ciclo do N em sistemas agrícolas

A composição química da atmosfera terrestre é formada por 78% de N na forma de N_2 (NASA, 2016). O N também participa da composição de biomoléculas como proteínas e seus derivados (enzimas, peptídeos, aminoácidos), além de ácidos nucleicos (DNA e RNA) presentes em todas as formas de vida (DIAS, 2016), tornando o elemento de extrema importância para a manutenção da biosfera no planeta.

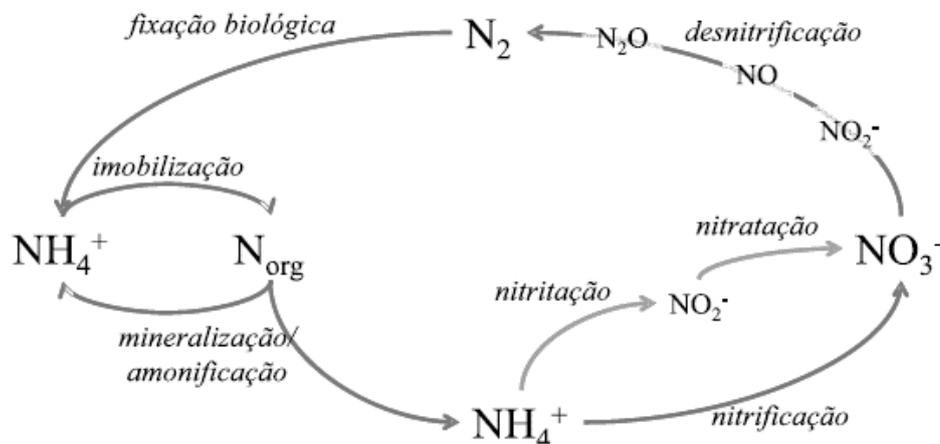
O N_2 é uma das formas gasosas do elemento, sendo considerada inerte por compor naturalmente nossa atmosfera e não reagir com outros elementos, além de não estar disponível para o uso da maior parte dos organismos. Para ser incorporado a biosfera, o N_2 atmosférico necessita ser convertido em formas assimiláveis por organismos. Uma das formas de entrada natural de N assimilável na atmosfera é através da ação de relâmpagos e vulcões. Considera-se que a maior fonte natural de N assimilável na biosfera é através da FBN na forma de amônia (NH_3^+) realizada por cianobactérias em ambientes aquáticos e por bactérias associativas e de vida livre em ambientes terrestres (JACOBSON et al., 2000).

As principais formas de N utilizadas pelos organismos são amoniacais (NH_4^+ , NH_3), nítricas (NO_3^-) e orgânicas (R- NH_2). Em sistemas naturais a entrada de N é bastante limitada, sendo que as quantidades disponibilizadas para posterior absorção são utilizadas com grande eficiência pelos organismos (ABER, 1989). Em sistemas agrícolas, as principais formas de N empregadas são as amoniacais e nítricas, vale ressaltar que elementos como o N, P, K e S estão relacionados diretamente com a produtividade de plantas de importância agrícola, sendo considerados elementos limitantes para o ciclo dessas (DIAS, 2016). A entrada de N em sistemas agrícolas se dá por meio de fertilizantes nitrogenados, produzidos através do processo industrial conhecido como Harber-Bosch (SMIL, 1999), e em menor quantidade, e não menos importante, através da FBN (VANCE, 2001).

As formas orgânicas de N (N-orgânico), presentes em solos agrícolas fazem parte predominantemente da matéria orgânica do solo e são passíveis de mineralização pela microbiota, tornando-se prontamente disponível para a absorção por plantas ou micro-organismos. Já a fração inorgânica de N em áreas agrícolas é composta por diferentes formas do elemento, principalmente NH_3^+ , nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), N_2O (em baixa quantidade), entre outras formas (DIAS, 2016).

O processo de transformação do N no solo abrange várias etapas, cada uma com sua importância biológica e mediada por uma grande diversidade de micro-organismos (Tabela 1 e Figura 1), que serão discutidos a seguir.

Figura 1 – Etapas do ciclo do N e suas transformações no solo



(DIAS, 2016)

2.4 Fixação Biológica de N

O N atmosférico em sua forma inerte N_2 , pode ser reduzido para formas assimiláveis através de organismos procariotos capazes de romper a tripla ligação que une as duas moléculas de N e transformá-lo em NH_3^+ , tal processo é conhecido como FBN (DIAS, 2016). A quebra dessa tripla ligação ocorre através da ação do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, presente em vários micro-organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* (POLY et al., 2001; DIXON; KAHN, 2004). Micro-organismos capazes de fixar N são também conhecidos como diazotróficos e podem ser encontrados em diferentes habitats, com diferentes estilos de vida. Existem micro-organismos diazotróficos de “vida livre”, presentes em solos e oceanos, e outros que vivem de forma associativa com outros organismos, como é o caso de plantas leguminosas (família Fabaceae) que são capazes de formar uma relação de simbiose com bactérias fixadoras de N, através da formação de nódulos nas raízes (LILBURN et al., 2001; WITTY et al., 1986). Os micro-organismos diazotróficos que habitam as raízes de leguminosas através da formação de nódulos são conhecidos como popularmente como rizóbios, é através dessa relação simbiótica que muitas culturas de interesse agrícola, como a soja, por exemplo, conseguem absorver o N em uma forma prontamente disponível que é viabilizada por esses micro-organismos, suprimindo parcialmente ou totalmente a necessidade de N dessas plantas (HUNGRIA, 2001).

A utilização do N disponibilizado pela FBN é de grande importância para a produção agrícola mundial, porque além de ser a principal fonte de entrada natural de N na biosfera, as formas de N disponibilizadas para absorção pela FBN ficam menos predispostas a perdas. Entretanto, o N aplicado como fertilizante em áreas agrícolas é mais susceptível a diversas formas de perdas como a lixiviação e a volatilização, causando a contaminação de corpos d'água e liberação de gases de efeito estufa como o N_2O que será discutido mais adiante (IPCC, 2013; PUCKETT; TESORIERO; DUBROVSKY, 2010).

A FBN é realizada por uma grande diversidade de micro-organismos. Entretanto, todos utilizam a mesma maquinaria bioquímica para a conversão do N_2 a NH_3^+ , que é através do complexo enzimático nitrogenase. A nitrogenase possui sistemas alternativos geneticamente independentes, sendo um desses sistemas (nitrogenase I), dependente de Mo e Fe (Figura 2) e codificada por um grupo de genes denominados *nif* (JOERGER et al., 1991; WAUGH et al., 1995). O gene *nifH* é responsável por codificar a subunidade de Fe-proteína da nitrogenase, e existe uma correlação positiva entre o gene *nifH* e o marcador filogenético *16S rRNA* de *Bacteria* (YOUNG, 1992; ZEHR et al., 2003). O uso do gene *nifH* como marcador molecular, tem sido amplamente utilizado para estudos de filogenia, diversidade e abundância de organismos cultivados e não-cultivados por ser capaz de fornecer o potencial de fixação em diferentes ambientes pelas comunidades microbianas diazotróficas (ZEHR et al., 2003). Yousulf et al. (2014), avaliaram a filogenia de diazotróficos em solos salinos, solos de agricultura e rizosfera e verificaram que a maior parte das comunidades encontradas nesses ambientes pertenciam aos filos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes.

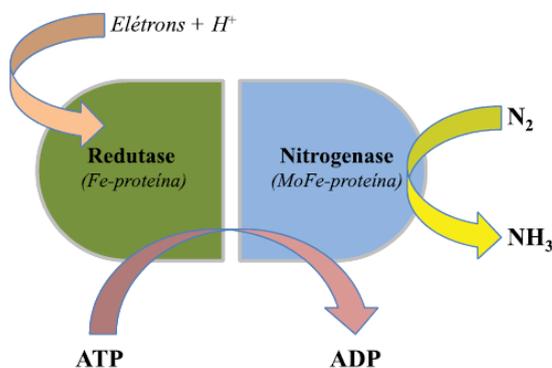
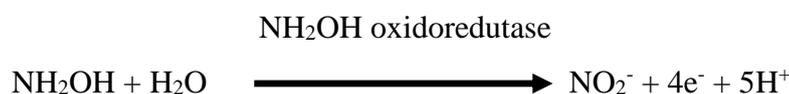
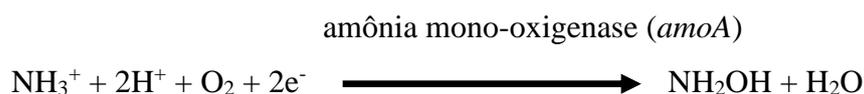


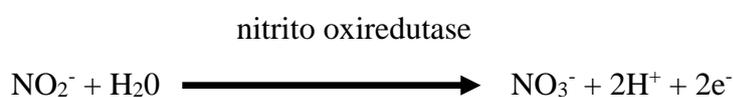
Figura 2 - Complexo enzimático da nitrogenase e o seu funcionamento

2.5 Nitrificação no solo

O processo de nitrificação autotrófica (**Figura 1**) consiste na conversão de NH_4^+ em NO_2^- e posterior conversão de NO_2^- para NO_3^- , essas oxidações são mediadas por dois diferentes grupos de micro-organismos, os oxidantes de amônia e oxidantes de nitrito (PAUL, 2014). A primeira etapa de conversão ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$), também conhecida como nitritaço, ainda é subdividida em mais duas outras etapas mostradas a seguir:



A conversão de amônia (NH_3^+) a hidroxilamina (NH_2OH) é mediada por uma enzima ligada a membrana de micro-organismos denominada amônia mono-oxigenase (AMO) presente em dos domínios *Archaea* e *Bacteria*. O segundo passo onde a hidroxilamina é convertida a nitrito, ocorre a liberação de 4 elétrons sendo 2 deles utilizados na primeira reação ($\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$), e os 2 restantes utilizados no metabolismo celular de micro-organismos. Micro-organismos oxidantes de amônia retiram sua energia através do consumo de CO_2 (dióxido de carbono) ou materiais carbonados e não através da matéria orgânica, além de serem aeróbicos obrigatórios (PAUL, 2014). Na segunda etapa principal da nitrificação, conhecida como nitratção, temos a conversão de NO_2^- para NO_3^- através da seguinte reação:



Na maioria dos solos, o processo de nitratção ocorre de maneira rápida, evitando o acúmulo de nitrito, já que o mesmo é instantaneamente utilizado por bactérias oxidantes de nitrito (PAUL, 2014).

2.5.1 Ecologia dos micro-organismos nitrificantes: nitritaço

Micro-organismos oxidantes de amônia participam do primeiro passo da nitrificação, através da oxidação da amônia. Tal processo é mediado por micro-organismos pertencentes

aos domínios *Bacteria* e *Archaea*. Os micro-organismos oxidantes de amônia são caracterizados por possuírem a enzima amônia mono-oxigenase, codificada por um grupo de genes denominados *amo*, que são amplamente utilizados como marcadores moleculares para estudos microbiológicos. Existem várias diferenças entre os dois grupos de micro-organismos. Para bactérias oxidantes de amônia (*AOB*) o produto intermediário da reação é a hidroxilamina (KOWALCHUK; STEPHEN, 2001), enquanto que em arqueias oxidante de amônia (*AOA*) o produto intermediário ainda é desconhecido (WALKER et al., 2010). Em geral, *AOB* são caracterizados como autotróficos obrigatórios, enquanto que *AOA* podem utilizar C orgânico como forma de energia, além disso, a estrutura da enzima AMO presente em *AOB* e *AOA* também diferem entre si (WALKER et al., 2010; ZHALNINA et al., 2012; KÖNNEKE et al., 2005).

As bactérias oxidantes de amônia pertencem predominantemente ao filo Proteobacteria, classe betaproteobactéria (NORTON, 2011), enquanto que arqueias oxidantes de amônia fazem parte em sua maioria do filo recentemente descoberto Thaumarchaeota, presente nos mais diversos ambientes como águas marinhas, fontes termais, sedimentos, solos e rizosfera (ZHALNINA et al., 2012; KÖNNEKE et al., 2005; BLAINEY et al., 2011; HATZENPICHLER et al., 2008; TOURNA et al., 2011).

O papel de cada comunidade de *AOA* e *AOB* no processo de oxidação da amônia ainda permanece indefinida. Enquanto alguns autores afirmam uma predominância de bactérias na oxidação de amônia em solos agrícolas (ZHANG et al., 2012), outros autores verificaram resultados contrários, onde foram observados a dominância de *AOA* na oxidação da amônia (OUYANG et al., 2016). Os dois grupos de micro-organismos, apesar de participarem da mesma etapa da nitrificação parecem ocupar diferentes nichos ecológicos, influenciados por fatores como pH, oxigênio e concentração de nutrientes (HATZENPICHLER 2012; XIE et al., 2014).

2.5.1 Ecologia dos micro-organismos nitrificantes: nitratação

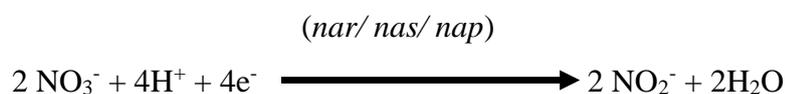
No processo de nitratação, o nitrito é rapidamente oxidado para nitrato, formando a última etapa da nitrificação. Esse processo é mediado por micro-organismos conhecidos como bactérias oxidantes de nitrito (*NOB*), distribuídos em várias classes de *Proteobacteria*, e do filo *Nitrospira* (ATTARD et al., 2010). O conjunto de primers *nxB*, é utilizado para avaliar a biogeografia e diversidade de micro-organismos do filo *Nitrospira*, que por sua vez, pode nos dar uma indicação sobre a abundância das comunidades microbianas oxidantes de nitrito em diversos ambientes (PESTER, 2014). De forma geral a nitratação não é considerada um

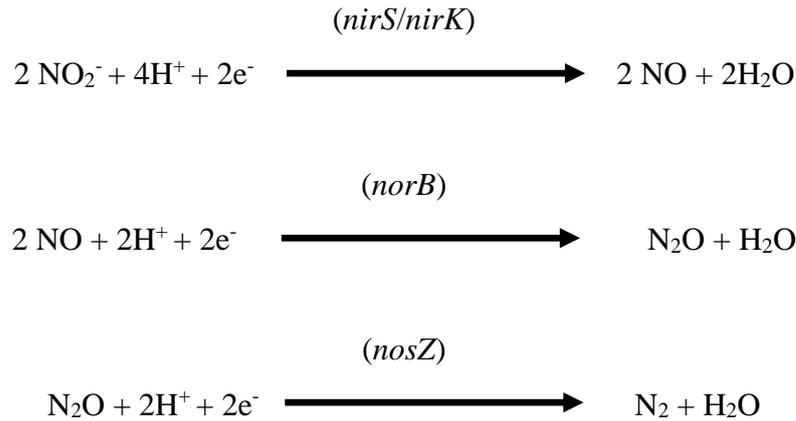
processo limitante para a nitrificação, uma vez que o nitrito não é acumulado no ambiente, entretanto, estudos indicam que em ambientes considerados perturbados, as comunidades de *NOB* no solo podem sofrer alterações e restringir o potencial de oxidação do nitrito (ATTARD et al., 2010; ROUX-MICHOLLET et al., 2008). Apesar dos avanços científicos, ainda existe um conhecimento muito limitado da importância de comunidades microbianas de *AOA*, *AOB* e *NOB* principalmente em ambientes tropicais. Entretanto, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para desenvolver uma compreensão mais completa dos fatores ambientais e diferentes manejos que influenciam esse micro-organismos no solo (PROSSER; NICOL, 2012).

2.6 Desnitrificação

A desnitrificação ocorre em microsítios anaeróbicos presentes no interior de agregados em solos aeróbicos e é mediado por micro-organismos que utilizam o nitrato como aceptor de elétron durante a respiração, e como resultado tem-se a formação de óxido nítrico (NO), N₂O e N na sua forma inerte (N₂) (JACOBSON et al., 2000). Micro-organismos desnitrificantes retiram sua energia através oxidação anaeróbica de compostos orgânicos como o NO₃⁻ e NO₂⁻. O nitrato é um aceptor de elétrons menos eficiente que o oxigênio (O₂), e por isso, a maioria das bactérias heterotróficas desnitrificantes apenas realizam a desnitrificação quando O₂ não está disponível, como é o caso de solos em épocas chuvosas (PAUL, 2014). A desnitrificação é o principal mecanismo pelo qual o N, fixado em ambientes aquáticos e terrestres, retorna para a atmosfera completando o ciclo do N, seja através da produção de sua forma inerte (N₂), ou ainda como N₂O ou NO. A desnitrificação ganhou destaque, principalmente pela produção de N₂O, considerado um importante gás de efeito estufa (IPCC, 2013) e um catalisador natural da degradação do ozônio estratosférico (BANGE, 2000). Além disso, a desnitrificação é um dos principais processos que leva a perdas de fertilizantes nitrogenados aplicados em ambientes agrícolas.

O processo de redução do nitrato até o N₂, é composto por 4 etapas e mediado por vários grupos de micro-organismos que requerem um gene específico para cada reação, representados a seguir:





(Adaptado de Black et al., 2016)

A primeira etapa da desnitrificação é a conversão do NO_3^- a NO_2^- , mediada pela enzima nitrato redutase, que por vez possui uma infinidade de variantes bioquimicamente distintas, podendo ser codificada por genes como *nar*, *nas* e *nap* (RICHARDSON et al., 2001). A segunda etapa da desnitrificação, responsável pela redução do NO_2^- para a forma gasosa NO, é catalisada pela enzima nitrito redutase. Dois tipos de nitrato redutase foram caracterizadas por serem diferentes em termos de estrutura, sendo elas a cobre nitrito redutase, codificada pelo gene *nirK*, e a citocromo cd1-nitrito redutase codificada pelo gene *nirS* (ZUMFT, 1997). Existe uma grande diversidade de micro-organismos mediadores da redução do nitrato, classificados em diversos grupos taxonômicos de bactérias como Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (HEYLEN et al., 2006). A terceira etapa da desnitrificação é a conversão de NO para N_2O , mediado pela enzima óxido nítrico redutase, que também é caracterizada por possuir uma série de variantes bioquimicamente distintas. O gene *norB* é responsável por codificar uma subunidade da enzima óxido nítrico redutase, e é amplamente utilizado como marcador funcional para caracterizar comunidades oxidantes de óxido nítrico (BRAKER; TIEDJE, 2003). A última etapa da nitrificação é a redução do N_2O para a forma inerte N_2 , presente naturalmente em nossa atmosfera. A enzima responsável por mediar esta última etapa é a óxido nitroso redutase, sendo o gene *nosZ* responsável por codificar uma das unidades catalíticas da enzima (HENRY et al., 2006). Assim, estudos moleculares baseados em marcadores funcionais como genes que codificam as principais enzimas do processo de desnitrificação tem o potencial de refletir as estruturas de comunidades desnitrificantes em amostras ambientais.

2.7 Etapas alternativas do ciclo do N

Além das etapas principais do ciclo do N, existem transformações secundárias como a redução dissimilatória do nitrato (NO_3^-) para amônia (NH_3^+), que ocorre particularmente em ambientes com alta disponibilidade de doadores de elétrons orgânicos e baixa concentração de nitrato (KING; NEDWELL, 1985), observado em diversos ambientes tropicais (DONG et al., 2009; LAM et al., 2009; DONG et al., 2011). Outra transformação secundária é a oxidação anaeróbica do nitrato (NO_3^-) e da amônia (NH_3^+) em N_2 , processo conhecido como anammox (MULDER, 1995). As bactérias que participam dessa transformação ocorrem em ambientes com concentrações limitadas de amônia e contribuem significativamente com o ciclo do N em ambientes marinhos (KUYPERS et al., 2003).

2.8 As entradas de C no solo

A entrada de C no solo ocorre principalmente através do processo de fotossíntese mediada por organismos autotróficos, onde o CO_2 atmosférico é fixado em compostos hidrocarbonatos com diferentes complexidades como a lignina, proteínas, óleos, ácidos nucléicos, carboidratos, celulose, hemicelulose e outros polímeros. Depois de fixados, esses compostos retornam ao solo na forma de resíduo vegetal, sendo posteriormente degradados pela microfauna e microbiota do solo, que regeneram esses compostos para a forma de CO_2 através de oxidações respiratórias. Outra forma de entrada de C no solo se dá pela lavagem de substâncias presentes na superfície de plantas carregadas pela chuva ou ainda através de rizodepósitos liberados por raízes de plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BRANDANI; SANTOS, 2016). Os chamados rizodepósitos, são caracterizados como metabólitos de baixo peso molecular, a base de C e que são liberados por raízes. Sabe-se que plantas podem exsudar até 40% do seu C fixado fotossinteticamente através das raízes, que incluem íons, enzimas, mucilagens e uma diversidade de compostos primários e secundários (PAUL, 2014).

2.9 O ambiente rizosférico

A região do solo que é influenciada pelas raízes através de seus exsudatos é denominada rizosfera, na qual reside um grande número de micro-organismos e invertebrados, considerada uma das interfaces mais dinâmicas da Terra (PHILIPPOT et al., 2013). O solo total, caracterizado por não ser influenciado por raízes ou também chamado de “*bulk soil*”, possui pouco C disponível para ser metabolizado como forma de energia por micro-organismos, fazendo dos rizodepósitos uma rica fonte de nutrientes, atraindo uma

grande quantidade de micro-organismos para a região onde ocorrem tais exsudações, tal fenômeno é conhecido como “efeito rizosférico” (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). A rizosfera pode ainda ser classificada em três regiões de acordo com a proximidade do solo com as raízes, sendo elas a i) endorrizosfera, caracterizada por incluir porções do córtex e endoderme (espaço apoplástico); ii) rizoplano, considerada a região de contato imediato entre a raiz e solo, incluindo a epiderme e a mucilagem; iii) ectorrizosfera, região seguida do rizoplano até o *bulk soil* (CAVAGLIERI et al., 2009; ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016).

Micro-organismos presentes na rizosfera de plantas podem desempenhar diversas funções. Em agrossistemas, por exemplo, micro-organismos rizosféricos podem estar relacionados a funções benéficas para a planta como a aquisição e disponibilidade de nutrientes (através da mineralização), estimulando o crescimento (hormônios promotores de crescimento) e tolerância a estresse (DOORNBOS et al., 2011; FERRARA et al., 2012; KAVAMURA et al., 2013).

A rizosfera pode ainda atrair micro-organismos considerados oportunistas, muitas vezes prejudicando o desenvolvimento da planta como é o caso de patógenos e predadores presentes no solo, que se alojam na rizosfera e aproveitam dos exsudatos liberados pelas plantas (BAIS et al., 2006). Hartmann et al. (2008) associou a resistência de plantas contra patógenos a composição microbiana da rizosfera. Micro-organismos como *Pseudomonas* spp. são relatados como espécies eficazes na redução de doenças transmitidas pelo solo (WELLER, 1998). Esses micro-organismos são capazes de antagonizar patógenos através de mecanismos como a produção de antibióticos, produção de quitinases e glucanases capazes de lisar células microbianas (BAKKER; VAN PEER; SCHIPPERS, 1991; SCHIPPERS, 1988).

A seleção de micro-organismos benéficos para planta pode ocorrer muitas vezes através da liberação de compostos que atuam como sinais bioquímicos específicos para atrair uma determinada comunidade do solo total para a rizosfera, esse mecanismo de seleção específica é conhecido como quimiotaxia. Um exemplo de quimiotaxia é a seleção de micro-organismos fixadores de N (associativos e de vida livre), para auxiliar na nutrição da planta, que se inicia através da liberação de sinais bioquímicos pela raiz da planta e que são captados apenas por uma parte da comunidade microbiana capaz de reconhecer esses sinais, e assim, iniciar o processo de colonização da rizosfera e interação com a planta (JONES et al., 2007; van LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

A rizosfera é caracterizada como sendo um ambiente extremamente lotado e com condições ambientais mais inóspitas em relação ao solo adjacente ou *bulk soil*. A quantidade de micro-organismos presentes na rizosfera pode chegar a um número próximo de 10^9 células

por grama de solo, o que pode favorecer a competição nesse ambiente por elementos como oxigênio e nutrientes (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). De forma geral, a rizosfera possui uma menor diversidade em relação ao solo total, uma vez que os micro-organismos presentes na rizosfera passam por uma “seleção” ou “recrutamento” executado pela planta a partir da biodiversidade presente no *bulk soil* (SMALLA et al., 2001).

Muitos fatores bióticos e abióticos influenciam a diversidade estrutural e funcional das comunidades microbianas na rizosfera. Fatores como o tipo de solo e a espécie de planta, influenciam a exsudação das raízes e conseqüentemente a seleção de micro-organismos pela rizosfera (BULGARELLI et al., 2012; LUNDBERG et al., 2012; COSTA et al., 2006; BERG; SMALLA, 2009). Além disso, propriedades físico-químicas do solo, cultivar, tipo de uso do solo e tipo de manejo são outros fatores que também influenciam no estabelecimento de micro-organismos no solo e conseqüentemente na rizosfera. (FIERER; JACKSON, 2006; LOPES et al., 2016; NAVARRETE et al., 2015; DURRER et al., 2017).

2.10 A mudança de uso do solo na região Amazônica

A Floresta Amazônica é considerada a mais extensa floresta equatorial do planeta e constitui em um dos maiores reservatórios de biodiversidade existentes nos trópicos, abrigando mais de 60% de todas as espécies de plantas e animais conhecidos (DIRZO; RAVEN, 2003; HECKENBERGER et al., 2007). Além de abrigar uma grande diversidade de espécies, a floresta desempenha funções essenciais para o planeta, como a manutenção de suprimentos de água doce, sequestro de carbono e a estabilização de processos biogeoquímicos (FEARNSIDE, 1999; DAVIDSON et al., 2012). Por ser uma área de grande extensão, e possuir diversas riquezas, a floresta vem sendo alvo de intensos desmatamentos conduzidos por ações antropogênicas como a exploração de minérios, expansão de áreas urbanas e intensificação agropecuária (SONTER et al., 2015; 2017; ARIMA et al., 2011). A consolidação do Brasil como exportador mundial de *commodities* como carne e soja por exemplo, acarretaram na expansão e intensificação de fronteiras agropecuárias no país, contribuindo com o desmatamento da Floresta Amazônica e uma conseqüente mudança de uso do solo. Estima-se que 15% da cobertura original da floresta foi desmatada e transformada em territórios destinados ao desenvolvimento agropecuário (SOARES-FILHO et al., 2006). Das áreas desmatadas, estima-se que 62% tornaram-se pastagens, 21% florestas secundárias e 5% áreas de cultivo de culturas anuais, sendo a soja a principal cultura (ALMEIDA et al., 2016). A produção de soja na região Amazônica cresceu mais de 25 vezes nos últimos 20 anos, de 0,3 para 2,4 milhões de toneladas, sendo acompanhado pelo aumento

da área plantada, que cresceu de 0,2 para 2,4 milhões de hectares (DIAS et al., 2016). No processo de desmatamento, toda madeira com valor comercial é retirada da floresta, em seguida, as árvores restantes são derrubadas, enleiradas e posteriormente queimadas para dar lugar a áreas de pastagem ou agricultura. A mudança de uso do solo em áreas de floresta é responsável por diversos tipos de alterações indo desde mudanças no estoque de C do solo, emissão de gases de efeito estufa, modificações na dinâmica de nutrientes no solo até alterações na diversidade, composição e abundância de genes (GUO; GIFFORD, 2002; FEARNSTIDE, 2000; McGRATH et al., 2001; PAULA et al., 2014). Sabe-se que a mudança de uso do solo leva a modificações das características físicas, químicas e biológicas originais do solo, o que conseqüentemente promove alterações da microbiota presente nesses ambientes (LISBOA et al., 2014; SCHEFFLER et al., 2011). A alteração da cobertura vegetal do solo e o depósito de cinzas pela queima da floresta podem contribuir para um aumento momentâneo de nutrientes nesses solos, tendo forte influência na biomassa microbiana e estrutura de comunidades bacterianas nessas áreas (FERNANDES et al., 2002; CENCIANE et al., 2009). Entretanto, com estabelecimento de culturas agrícola ao longo dos anos, a biomassa microbiana pode sofrer uma redução e posterior estabilização do longo do tempo, assemelhando-se ao conteúdo da floresta inicialmente ali presente (FERNANDES, 1999; CENCIANE et al., 2009).

A conversão de florestas para áreas de exploração agropecuária podem alterar a diversidade taxonômica de bactérias verificadas nesses solos, homogeneizando a beta diversidade e aumentando a alfa diversidade (RODRIGUES et al., 2013).

2.11 Técnicas moleculares no estudo de micro-organismos do solo

O acesso a micro-organismos foi limitado e praticamente inexistente ao longo dos séculos, sendo considerada uma parte desconhecida das ciência por muito tempo. O avanço da microscopia, a descoberta e estudo do DNA e o desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu o acesso à fração do solo conhecida como “caixa preta” da vida microbiana, definição dada a fração orgânica do solo e os organismos presentes nesse ambiente, que até poucas décadas atrás era desconhecida (PAUL, 2014).

O uso de técnicas moleculares a partir do DNA total o solo, possibilitou acessar em larga escala, micro-organismos sem a dependência de técnicas de cultivo, cujo limite de obtenção é de apenas 1% da diversidade microbiana existente (SCHUTTE et al., 2008; CURTIS; SLOAN, 2004; YOSHIURA, 2014). Atualmente é possível extrair ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA) a partir de células contidas em amostras

de solo e analisá-los diretamente em experimentos de hibridação, amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ainda utilizar técnicas de alta resolução como as plataformas de sequenciamento de nova geração. Os avanços nos métodos moleculares permitiram acessar 90-99% da fração microbiológica do solo até então desconhecida, que em sua maioria ainda não foi caracterizada (PAUL, 2014). Apesar da alta resolução das técnicas moleculares utilizadas atualmente para o estudo de micro-organismos do solo, as mesmas possuem limitações que devem ser considerados na interpretação dos resultados, afim de se obter informações mais confiáveis. Nesse contexto, é recomendado que os métodos moleculares devam ser usados em conjunto com outras abordagens (denominadas abordagens polifásicas ou multifásicas) para alcançar uma compreensão mais holística da estrutura e função das comunidades microbianas do solo (PAUL, 2014).

A técnica de PCR, por exemplo, permite a amplificação de fragmentos-alvo de DNA extraídos de amostras de interesse. A PCR é uma técnica de amplificação de DNA alvo que utiliza elementos como a enzima DNA-polimerase, duas sequências oligonucleotídicas específicas (*primers*) que flanqueiam a região de interesse, nucleotídeos, e outros reagentes que são necessários para otimizar a reação. É um processo cíclico que consiste na separação da dupla fita de DNA (desnaturação), anelamento de *primers* que se ligam em regiões específicas da fita única de DNA e a síntese de uma nova fita de DNA (elongação) através da ação da enzima DNA-polimerase. Vale ressaltar que cada uma das etapas é mediada por diferentes temperaturas (MULLIS; FALOONA, 1987). A PCR é utilizada como base para diversas outras técnicas como as de *fingerprinting*, por exemplo, que permitem acessar a estrutura de comunidades microbianas sem a necessidade de técnicas de cultivo, através da detecção da presença ou ausência do gene alvo (VERSALOVIC et al., 1994). O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) também é uma técnica derivada da reação em cadeia da polimerase. A qPCR permite a quantificação precisa de ácidos nucleicos específicos em uma mistura complexa mesmo que a quantidade inicial do material esteja em uma concentração muito baixa (dependente da sensibilidade do aparelho responsável pela reação). A reação é obtida pelo monitoramento em tempo real da amplificação de uma sequência-alvo utilizando fluorescências. A rapidez com que o alvo amplificado atinge um nível de detecção limiar correlaciona-se com a quantidade inicial de DNA na amostra (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). A técnica de qPCR é amplamente utilizada para o estudo de micro-organismos do solo, permitindo acessar a abundância de diferentes comunidades e elucidando o papel destas em diferentes ambientes (HANDELSMAN; SMALLA, 2003).

O avanço de tecnologias em sequenciamento de DNA aliado a ferramentas de bioinformática permitiu a exploração da diversidade genética de micro-organismos não cultiváveis nos mais diversos ambientes. O sequenciamento de *amplicon* por exemplo, é considerado o método mais utilizado para a caracterização da diversidade de micro-organismos. Para a realização da técnica é necessário a extração de DNA das amostras de interesse, como o solo por exemplo. Um marcador filogenético, presente em todos os micro-organismos de interesse é utilizado, e amplificado por uma reação de PCR. Posteriormente, o produto da PCR é sequenciado e caracterizado através de ferramentas de bioinformática para determinar quais micro-organismos estão presentes na amostra e sua abundância relativa (SHARPTON, 2014).

Embora existam plataformas de sequenciamento com maior resolução, como a metagenômica, por exemplo, que permite associar funções biológicas aos táxons identificados na amostra, o estudo de *amplicon*, em especial com o marcador filogenético 16S rRNA, é uma ferramenta de alta resolução utilizada para documentar a biodiversidade inexplorada e as características ecológicas de comunidades em diversos microbiomas (CAPORASO et al., 2011).

O gene 16S ribossomal (rRNA) é amplamente utilizado em sequenciamentos de *amplicon* como marcador taxonômico e filogenético. O mesmo é responsável por codificar a menor sub-unidade que compõe o ribossomo, sendo uma região altamente conservada do DNA. Em procariotos, o gene *16S rRNA* é classificado como essencial e possui ao menos uma cópia no genoma. O gene também está presente em genomas mitocondriais, que perderam a maioria de seus genes ancestrais ao longo do processo evolutivo de simbiose com outras células. A universalidade do *16S rRNA* fez dele um marcador ideal para estudos filogenéticos e classificações taxonômicas (GRAY; BURGER; LANG, 1999; ACINAS et al., 2004).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O presente estudo se baseou na hipótese de que micro-organismos relacionados ao ciclo do N em solos tropicais tem um aumento em sua abundância e uma homogeneição na estrutura dessas comunidades microbianas com o uso agrícola do solo ao longo do tempo.

3.2 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a dinâmica de micro-organismos envolvidos no ciclo do N, sob influência de uso do solo ao longo do tempo, correlacionando variáveis ambientais, perfil taxonômico de *Bacteria* e *Archaea* e abundância de genes funcionais em solos agrícolas, rizosfera e, como comparativo, solo de floresta primária, da Amazônia Oriental.

3.2.1 Objetivos específicos

- Quantificação dos genes marcadores filogenéticos *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea* e dos genes funcionais *nifH*, *AOA*, *AOB*, *nirK* e *nosZ* em amostras de solo agrícola, rizosférico e floresta primária.
- Determinação de estimativas de diversidade, perfil taxonômico e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas áreas de estudo a partir do sequenciamento em larga escala dos genes *16S rRNA*.

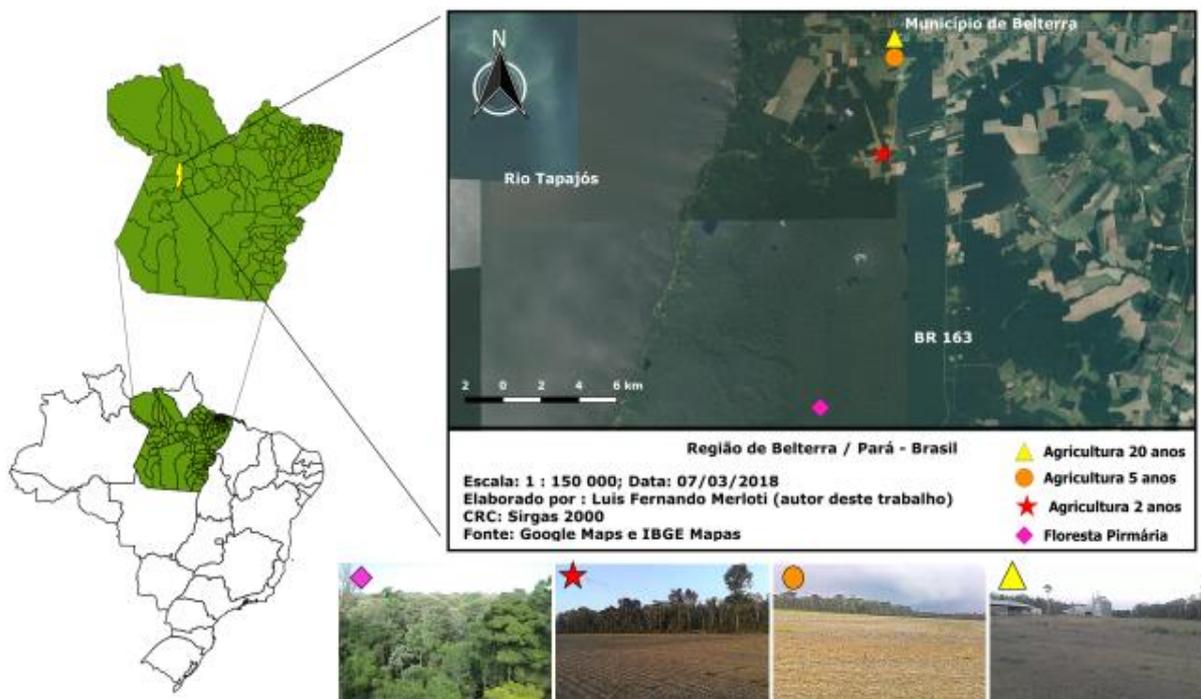
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das áreas de estudo

As amostras de solo foram coletadas em quatro áreas localizadas na Mesorregião do Baixo Amazonas, no estado do Pará, no município de Belterra. O clima regional é classificado como tropical húmido com temperatura média anual de 26 °C e uma precipitação média anual de 2150 mm (INPE, 2016).

Os locais de amostragem (Figura 2) foram selecionados de acordo com a cobertura vegetal, tipo de manejo do solo e tempo de conversão de áreas de floresta para áreas de exploração agropecuária.

Figura 2 – Localização das áreas de estudo



4.1.1 Áreas de agricultura

As áreas de agricultura amostradas, foram locais que inicialmente eram cobertos por floresta nativa, e foram convertidos para áreas de exploração agropecuária em diferentes anos. As áreas amostradas possuem as seguintes idades e coordenadas geográficas:

- Área de agricultura com aproximadamente 2 anos (W 54° 55' 80.2'' S 2° 44' 22.6'', altitude de 184 m)
- Área de agricultura com aproximadamente 5 anos (W 54° 55' 46.8'' S 2° 41' 52.1'', altitude de 160 m)
- Área de agricultura com aproximadamente 20 anos (W 54° 55' 46.5'' S 2° 40' 98.1'', altitude de 158 m)

Todas as áreas de agricultura (Figura 2) amostradas foram manejadas com a prática agrícola do cultivo mínimo, visando um menor revolvimento do solo e uma menor compactação. Práticas agrícolas como semeadura direta, colheita mecanizada, rotação de culturas, adubação, calagem e uso de defensivos foram utilizadas nas três áreas ao longo dos anos. A principal cultura cultivada em grande parte do ano nas três áreas selecionadas é a soja (*Glycine max*) rotacionada com a cultura do milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e outras plantas de cobertura.

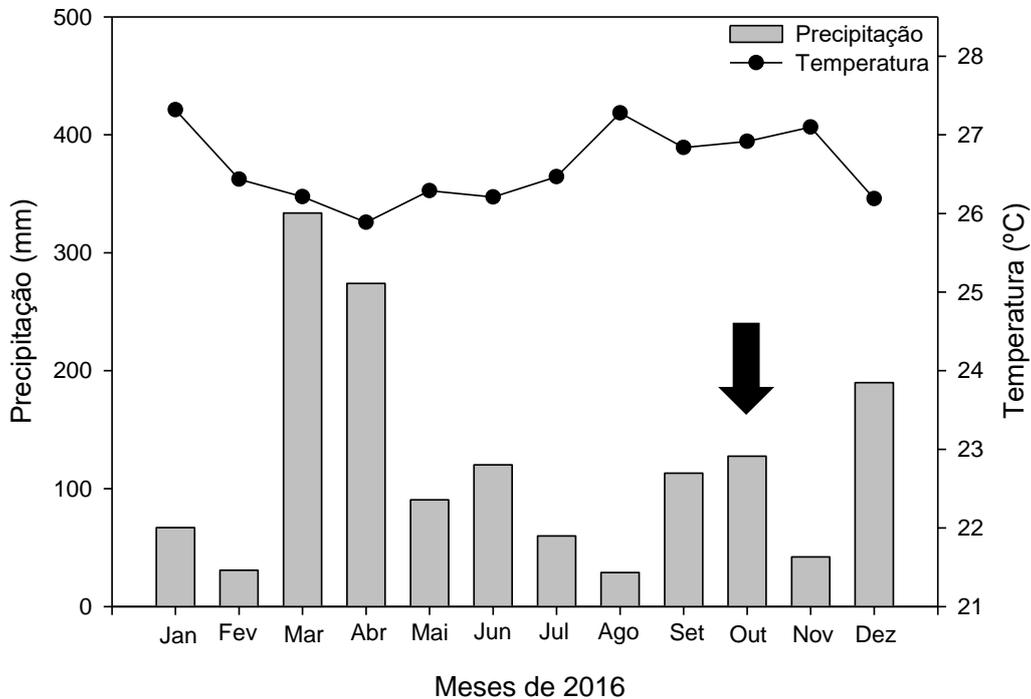
4.1.2 Floresta nativa

A área de floresta primária (W 54° 57' 50.1'' S 2° 51' 32.6'') escolhida para o presente trabalho está localizada no quilômetro 67 da Floresta Nacional do Tapajós, importante unidade de conservação da natureza e cobertura florestal fortemente preservada, localizada às margens do Rio Tapajós, na Bacia Amazônica (Figura 2).

4.2 Amostragem

As amostragens nas áreas de estudo foram realizadas no mês de outubro de 2016, período caracterizado por ter um baixo regime de chuvas (início do período chuvoso) e temperaturas mais amenas, sendo considerado o período de seca na região. A Figura 3 representa as condições climáticas da região de Belterra no ano de 2016, que no mês de outubro apresentou temperatura média de aproximadamente 27 °C e precipitação acumulada de 127 mm.

Figura 3 – Precipitação total acumulada e temperatura média mensal durante o ano de 2016. A seta indica o mês em que foram realizadas as amostragens. Dados obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), referentes à Estação 82246 (Belterra, PA)



4.3 Coleta e processamento das amostras de solo

Nas áreas de agricultura e floresta nativa, a amostragem foi realizada num transecto de 3 pontos (50 m de distância entre cada ponto), onde a camada de serapilheira foi retirada e o solo da camada de 0 a 10 cm de profundidade foi coletado. Parte do solo de cada ponto foi armazenado em um tubo do tipo Falcon de 50 ml e congelado a -20°C para melhor conservação do material visando à extração de DNA. O restante do solo foi armazenado em gelo seco e transportado para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba-SP para a realização de análise química e experimento em mesocosmo.

4.4 Experimento em mesocosmo

O experimento em mesocosmo em casa-de-vegetação, utilizando a soja como planta modelo, teve como objetivo normalizar as condições adversas observadas em campo como o regime de chuva e variações na temperatura sobre as condições de crescimento das plantas. Os mesocosmos foram compostos por vasos plásticos com capacidade para 8 L, com medidas de 22 cm de altura, 23 cm de diâmetro superior e 19 cm de diâmetro inferior. Uma camada de pedra (devidamente esterilizada) de 5 cm foi adicionada no fundo de cada vaso para evitar o acúmulo de água. O solo coletado em cada área de agricultura foi homogeneizado, peneirado e posteriormente adicionados aos vasos plásticos formando o mesocosmo.

Foram semeadas nos mesocosmos sementes de soja RR IPRO comumente utilizadas em áreas de agricultura na região de Belterra-PA. Além disso, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, na concentração de 10^{10} células viáveis por kg de semente, prática usualmente utilizada no Brasil afim de estimular a nodulação na cultura da soja. Não foram realizadas adubações durante a condução do experimento. O delineamento constou com 6 vasos por área (3 vasos sem planta + 3 vasos com planta) e 3 repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Os mesocosmos com solo de floresta primária e com plantas de soja foram descartados, sendo utilizado apenas os mesocosmos sem plantas. As amostras de solo rizosférico foram coletadas no fim da fase vegetativa de desenvolvimento das plantas de soja (45 DAS) ou início do florescimento. As plantas foram removidas do mesocosmo, e o solo intimamente agregado as raízes foi coletado com luvas e escovas devidamente esterilizadas. As amostras foram congeladas para posterior extração de DNA total e análise química.

4.5 Análises físico-químicas das amostras de solo

Cerca de 600 g de solo coletado em campo e em experimento de mesocosmo (rizosfera) foi enviado para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para análise de suas propriedades físico-químicas.

Foram determinados parâmetros de fertilidade do solo coletados em experimento de mesocosmo, que consistiu na determinação do N total, NH_3^+ , NO_3^- pelo método de digestão sulfúrica/Kjeldahl; pH em CaCl_2 ; P, K^+ , Ca e Mg, pela extração em resina trocadora de íons; S pelo método de extração em $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; Al pela extração em KCl; acidez potencial (H+Al) pelo pH SMP; C orgânico (M.O.) pelo método de dicromato/titulométrico; B pela extração com água quente; Cu, Fe, Mn e Zn extraídos pelo extrator DPTA-TEA (pH 7,3); e cálculos de

soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC), saturação por bases (V%), saturação por alumínio (m%) e N disponível. Adicionalmente foram realizadas análises texturais de todas as áreas para determinação dos teores de areia, silte e argila pelo uso de densímetro.

4.6 Extração de DNA do solo

O DNA total, dos solos de campo e rizosfera, foi extraído em duplicata com o *Power Soil DNA Extraction Kit* (MoBio Laboratories), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade e quantidade das amostras foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. O DNA total foi extraído e armazenado a -20 °C.

4.7 PCR quantitativo em tempo-real

A técnica de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) foi utilizada para quantificar genes descritos na Tabela 2, à partir das amostras de DNA total extraídos de solos de campo e rizosfera. Para cada gene, foi construída uma curva padrão entre 10^1 a 10^{10} cópias do gene de interesse, obtido previamente pela técnica de PCR a partir de estirpes padrão fornecidas pela DSMZ (do inglês *Deutsch Collection of Microorganism and Cell Cultures*) ou através de amostras ambientais. A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems), com um volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L do *SYBR Green ROX qPCR* (Thermo Fisher Scientific), 1,5 μ L de cada *primer* (5 pmols), 1 μ L de DNA e 2 μ L de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

Tabela 2 - Primers utilizados para a amplificação dos genes *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*, *amoA* de *Bacteria*, *amoA* de *Archaea*, *nifH*, *nirK* e *nosZ*

| Genes alvo | Primers | Sequência (5'-3') | Tamanho fragmento (pb) | Referência | Condições de Amplificação | |
|---|------------------------------------|----------------------------------|--|------------|---|---|
| Marcadores Filogenéticos | <i>16S rRNA</i> <i>Bacteria</i> | Eub 338f Eub 518r | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG | 180 | Bakke et al. (2011) | 95°C - 10 min; 40 ciclos, 94°C – 15 s, 56°C - 30 s e 72 °C - 45 s |
| | <i>16S</i> <i>Archaea</i> | 519F 915R | CAGCCGCCGCGGTAA GTGCTCCCCCGCCAATTCCT | 397 | Klindworth et al. (2013) Stahl; Amann (1991) | 95°C - 10 min; 40 ciclos, 95°C – 30 s, 57°C - 30 s e 72 °C -50 s |
| | <i>nifH</i> | - | AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT | 457 | (Wallenstein; Vilgalys, 2005) | 95°C - 5 min; 40 ciclos, 95 °C – 30 s, 59°C - 30 s e 72°C – 1 min e 72° C – 1 min |
| Genes funcionais associados ao ciclo do N | <i>amoA</i> de <i>Bacteria</i> | <i>amoB 1F</i> <i>amoB 2F</i> | GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC | 491 | Rotthauwe et al. (1997) | 95°C - 10 min; 40 ciclos, 95°C - 45 s, 60°C - 45 s e 72°C - 45 s. |
| | <i>amoA</i> de <i>Archaea</i> | <i>amoA1F</i> <i>amoA 2F</i> | STA ATG GTC TGG CTT AGA CG GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT | 635 | Francis et al. (2005) | 95°C - 5 min; 40 ciclos, 95°C - 40 s, 56°C - 30 s e 72°C - 60 s. |
| | <i>nirK</i> | 876 F 1040 R | ATYGGCGVCAAYGGCGA GCCTCGATCAGRTTRTGTT | 520 | Henry et al. (2004) | 95°C - 10 min; 6 ciclos, 95°C - 15 s, 63°C - 30 s e 72°C - 40 s; 95°C – 30 s, 38 ciclos, 58°C – 30s, 72°C – 40 s. |
| | <i>nosZ</i> | <i>nosZ 2F</i> <i>nosZ 2R</i> | CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA | 267 | Henry et al. (2006) | 95 °C-15s/ 60 °C 40s/ 72 °C 40s |

4.8 Sequenciamento em larga escala dos genes *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*

O sequenciamento em larga escala foi realizado no Centro de Genômica Funcional-ESALQ/USP, a partir de amostras de DNA total de solo coletado em campo e do experimento em casa de vegetação.

As amplificações em PCR foram realizadas com o conjunto de *primers* descritos na Tabela 3, que são responsáveis pela amplificação da região V3-V4 do gene *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*. A plataforma utilizada para o sequenciamento foi *Miseq* (Illumina, USA), com leituras pareadas de 250 bp (2x251).

Tabela 3 - Primers utilizados no sequenciamento em larga escala para a amplificação do gene *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*

| Genes alvo | Primers | Sequência (5' - 3') | Referência |
|------------------------------------|---------------|--|-----------------------------|
| <i>16S rRNA</i> <i>Bacteria</i> | 341F 745R | CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC | Klindworth et al. (2013) |
| <i>16S rRNA</i> <i>Archaea</i> | 915F 1386R | AGGAATTGGCGGGGAGCAC GCGGTGTGTGCAAGGAGC | Kittelman et al., (2013) |

4.9 Análise dos dados

Os dados físico-químicos obtidos entre os tratamentos foram organizados no programa Excel (Microsoft) e testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de comparação de médias Kruskal-Wallis a 5% de significância no software R (R CORE TEAM, 2013) através do pacote Agricolae (MENDIBURU, 2014). A partir dos dados químicos, foram realizadas três comparações entre os solos amostrados. A primeira comparação foi realizada entre a área de floresta primária e as áreas de agricultura sob uso do solo ao longo do tempo (FP x AGR 2 x AGR 5 x AGR 20) e com diferenças representadas por letras minúsculas. A segunda comparação foi feita entre solos rizosféricos sob efeito de uso do solo ao longo do tempo (RIZ 2 x RIZ 5 x RIZ 20), com as diferenças evidenciadas por letras maiúsculas. E a terceira e última comparação apresenta os resultados para a interação entre solos de AGR e RIZ sob influência do solo ao longo do tempo (AGR2 x RIZ2; AGR5 x RIZ5 e AGR20 x RIZ20), com diferenças representadas por (*).

Os dados da análise qPCR foram obtidos pelo StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), deste foram exportados para o programa Excel (Microsoft) onde foram calculadas as quantidades de cópias do gene para cada grama de solo. Os dados de qPCR obtidos dos solos avaliados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de comparação de médias Kruskal-Wallis a 5% de significância no software R (R CORE TEAM, 2017) através do pacote Agricolae (MENDIBURU, 2017), entre todos os ambientes avaliados.

As sequências resultantes da análise de sequenciamento de *amplicons* de *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea* foram pré-processadas, filtradas por qualidade e analisadas através do software Qiime2 – versão 11 de 2017 (ROUSK et al., 2010). A ferramenta dada2 (CALLAHAN et al., 2017) foi utilizada para correção das sequências e remoção de quimeras utilizando método consenso. As sequências *forward* e *reverse* após unidas apresentaram baixa qualidade média por *read*, que causaram uma redução de aproximadamente 3/5 das sequências por amostra. Optou-se por usar somente as sequências *forward* para as análises seguintes. As sequências *forward* foram filtradas seguindo os parâmetros de qualidade recomendados pelo software, agrupando as *reads* em 220 pb. A identificação taxonômica foi realizada através da ferramenta q2-feature-classifier, treinada utilizando os *primers* do sequenciamento e utilizando o banco de dados SILVA (versão 128) (QUAST et al., 2013).

As análises de correlações foram realizadas através do teste de Spearman, pelo software SigmaPlot (San Jose, CA, USA).

As análises de redundância (RDA) foram realizadas no software Canoco versão 4.5. (TER BRAAK; SMILAUER, 1998) baseadas no teste permutação de Monte Carlo a 5% de significância.

As análises de agrupamento (Permanova, a 5% de significância), índice de Chao e índice de Shannon foram realizadas pelo software PAST versão 3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Os gráficos e tabelas foram realizados através dos softwares PowerPoint e Excel (Microsoft), SigmaPlot (San Jose, CA, USA) e Canoco Draw (TER BRAAK; SMILAUER, 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os solos possuíam a mesma classificação textural, com alto conteúdo de argila, sendo classificados como muito argilosos.

5.1 Propriedades químicas dos solos analisados

Foram verificadas diferenças nos parâmetros químicos dos solos de agricultura (AGR), rizosfera (RIZ) e floresta primária (FP) sob influência de uso do solo ao longo do tempo.

5.1.1 Comparação entre os solos de floresta primária e agricultura sob uso do solo ao longo do tempo

Na comparação entre o solo de floresta primária (FP) e os solos de agricultura (AGR) sob uso do solo ao longo do tempo (Tabela 4), observou-se que o solo de FP apresentou menor quantidade de NH_3^+ , NO_3^- , N disponível, pH, P, K, Ca e Zn. Entretanto, as quantidades de B e Fe foram maiores no solo de FP em relação aos demais ambientes.

O conteúdo de N total no solo de FP foi semelhante nos solos sob uso agrícola, entretanto, a quantidade de N disponível (NH_3^+ + NO_3^-) presente nesse ambiente foi bem inferior quando comparado com os demais solos, indicando alta imobilização do N em ecossistemas naturais.

De forma geral, os solos da região Amazônica cobertos por floresta nativa são caracterizados por apresentarem uma baixa quantidade de nutrientes, boa profundidade e drenagem, alta retenção de água e alto teor de argila (FERREIRA et al., 2016). A capacidade da Floresta Amazônica em se desenvolver em solos ácidos, intemperizados e pobres em nutrientes está relacionada com a entrada de serapilheira, que posteriormente é decomposta e responsável pela liberação gradativa de nutrientes no solo que são responsáveis pela manutenção da Floresta (NEVES et al., 2001).

As variáveis químicas dos solos de AGR sob uso do solo ao longo do tempo apresentaram algumas diferenças. O conteúdo de N total foi maior no solo de AGR 20 anos quando comparado com o solo de AGR 2 anos. Os conteúdos de NO_3^- e N disponível foram maiores no solo de AGR 2 anos quando comparados com os solos de AGR 20 anos e FP.

O solo de AGR 20 anos apresentou maior conteúdo de M.O. em relação aos solos de AGR 5 anos e FP.

Os maiores valores observados para amônio e nitrato em solos de AGR em relação ao solo de FP podem estar relacionados as formas de N que entram nesses diferentes ambientes. Em áreas de agricultura é comum a aplicação de fertilizantes amoniacais e nítricos para suprir a necessidade nutricional de culturas agrícolas, o que pode explicar as maiores quantidades de amônio e nitrato observados nos solos de uso agrícola do presente estudo. Entretanto, a entrada do N em áreas de floresta nativa ocorre através da decomposição da serapilheira e da FBN, que acontecem de forma bastante limitada e com alto aproveitamento por parte dos organismos presentes nesse ambiente (ABER, 1989). De forma geral, os solos sob uso agrícola apresentaram valores de fertilidade semelhantes, diferindo em sua maioria do solo coberto por floresta nativa.

5.1.2 Comparações entre rizosferas sob uso do solo ao longo do tempo

Na comparação entre rizosferas sob efeito de uso do solo ao longo do tempo (Tabela 4), verificou-se que a rizosfera da área de 2 anos (RIZ 2) apresentou maiores valores para NH_3^+ , N disponível e Zn quando comparada com a rizosfera da área de 20 anos (RIZ 20). Para os parâmetros M.O., pH, Ca, SB, CTC e V%, a RIZ 20 apresentou maiores valores. A rizosfera da área de 5 anos (RIZ 5) apresentou maiores valores para Mg e H+Al. De forma geral o solo rizosférico da área de 20 anos apresentou uma maior fertilidade em relação as demais rizosferas, o que pode estar relacionado com seu pH mais elevado, sua menor acidez potencial e maior quantidade de matéria orgânica.

Em relação as formas de N disponíveis nesses ambientes, verificou-se que o conteúdo de amônio e nitrato apresentados pelos três solos rizosféricos foi baixo, o que pode estar relacionado com a alta imobilização de N que ocorre em ambientes rizosféricos (BADALUCCO, KUIKMAN, 2001). Além disso, o conteúdo de nitrato observado nos solos rizosféricos foi muito baixo, o que pode estar relacionado com a susceptibilidade da molécula de nitrato em sofrer perdas através de processos como a lixiviação e desnitrificação (SILVER, HERMAN, FIRESTONE, 2001), ou ainda absorção pelas raízes de plantas (ZHONG et al., 2014).

5.1.3 Interação entre solos de agricultura e rizosfera sob uso do solo ao longo do tempo

A Tabela 4 também apresenta os resultados para a interação entre solos de AGR e RIZ sob influência do uso do solo ao longo do tempo. O objetivo da interação foi observar como a presença de raízes altera os parâmetros químicos do solo, utilizando os solos de AGR como controles, ou seja, solos que não estão sob influência das raízes.

O conteúdo de N total não foi alterado pela presença de raízes. Contudo as quantidades de amônio, nitrato e N disponível, foram menores em todas as rizosferas, o que pode indicar alta imobilização do N pela microbiota, perdas por lixiviação e desnitrificação ou absorção das forma de N pela planta. Observou-se maiores valores para o pH na RIZ 2 e 20 anos quando comparadas com seus respectivos controles (AGR 2 e 20 anos). O conteúdo de P também foi maior na RIZ 5 em relação ao seu controle. Essas alterações podem estar relacionadas com a liberação de exsudatos pelas raízes, que podem modificar as condições químicas do ambiente rizosférico para favorecer a absorção de nutrientes e recrutamento de micro-organismos benéficos para o desenvolvimento da planta (MENDES et al., 2014, GILES et al., 2018).

Os menores valores verificados nos ambientes rizosféricos quando comparados com seus controles (AGR), podem estar relacionados com a absorção dos elementos pelas plantas ou ainda indicar lixiviação desses elementos durante a condução do experimento em casa de vegetação (realizado para coletar a rizosfera de plantas de soja).

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos parâmetros químicos do solo em áreas de Agricultura (Agr.), Rizosfera (Riz.) e Floresta Primária (FP), sob influência de uso do solo ao longo do tempo

| Parâmetros Químicos do Solo | Unidade | FP | Agr. | | | Riz. | | | Agr. X Riz. | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|----|----|----|
| | | | 2 | 5 | 20 | 2 | 5 | 20 | 2 | 5 | 20 | |
| | | ----- Anos ----- | | | | | | ----- Anos ----- | | | | |
| Macro - nutrientes | N total | g kg ⁻¹ | 2265,7 ± 77,1 ab | 2072,0 ± 98,7 b | 2272,7 ± 98,1 ab | 2401,0 ± 54,7 a | 2186,3 ± 241,1 | 2338,0 ± 219,2 | 2492,0 ± 135,0 | ns | ns | ns |
| | NH ₃ ⁺ | mg kg ⁻¹ | 10,3 ± 2,2 b | 57,3 ± 14,2 a | 56,0 ± 7,0 a | 10,1 ± 0,2 ab | 6,7 ± 0,6 A | 4,0 ± 0,7 AB | 3,6 ± 0,5 B | * | * | * |
| | NO ₃ ⁻ | mg kg ⁻¹ | 4,7 ± 2,5 c | 65,7 ± 14,4 a | 51,7 ± 2,3 ab | 21 ± 1,1 bc | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | * | * | * |
| | N disponível | mg kg ⁻¹ | 15,0 ± 3,9 c | 123,0 ± 9,6 a | 107,7 ± 9,1 ab | 31,2 ± 1,2 bc | 6,7 ± 0,6 A | 4,0 ± 0,7 AB | 3,6 ± 0,5 B | * | * | * |
| | pH (CaCl ₂) | - | 3,2 ± 0,2 b | 5,3 ± 0,2 ab | 5,5 ± 0,2 a | 5,5 ± 0,1 a | 6,2 ± 0,1 AB | 5,9 ± 0,5 B | 7,0 ± 0,1 A | * | ns | * |
| | M.O. | g dm ⁻³ | 33,0 ± 1,0 b | 36,0 ± 2,0 ab | 27,3 ± 9,8 b | 37,7 ± 1,5 a | 27,0 ± 0,0 B | 32,0 ± 0,0 A | 32,7 ± 1,2 A | * | ns | * |
| | P | mg dm ⁻³ | 8,2 ± 1,3 b | 33,7 ± 4,7 ab | 31,0 ± 20,5 ab | 49,0 ± 9,8 a | 36,3 ± 6,1 | 37,3 ± 5,5 | 34,0 ± 0,0 | ns | * | * |
| | S | mg dm ⁻³ | 19,0 ± 4,9 | 10,33 ± 3,2 | 10,33 ± 0,6 | 9,0 ± 2,0 | 3,7 ± 1,2 | 5,0 ± 2,6 | 5,7 ± 2,5 | * | * | ns |
| | K ⁺ | mmolc dm ⁻³ | 0,8 ± 0,1 b | 2,6 ± 0,2 a | 2,3 ± 0,3 ab | 3,4 ± 1,1 a | 1,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 | * | * | * |
| | Ca ⁺² | mmolc dm ⁻³ | 3,2 ± 0,4 b | 84,3 ± 5,1 a | 56,8 ± 36,0 ab | 89,7 ± 1,2 a | 42,0 ± 4,4 B | 42,3 ± 6,4 AB | 62,3 ± 3,5 A | * | ns | * |
| | Mg ⁺² | mmolc dm ⁻³ | 11,6 ± 0,5 | 22,3 ± 3,5 | 34,7 ± 26,1 | 18,7 ± 5,7 | 9,7 ± 0,6 AB | 12,3 ± 2,9 A | 7,7 ± 0,6 B | * | ns | * |
| | H ⁺ + Al ⁺³ | mmolc dm ⁻³ | 98,3 ± 10,5 | 19,3 ± 2,3 | 25,7 ± 19,1 | 19,3 ± 1,2 | 17,3 ± 1,2 B | 24,7 ± 8,1 A | 11,7 ± 0,6 C | ns | ns | * |
| | SB | mmolc dm ⁻³ | 5,6 ± 0,9 | 109,3 ± 1,9 | 93,8 ± 54,5 | 111,7 ± 7,9 | 52,9 ± 5,0 B | 55,8 ± 9,4 AB | 71,1 ± 2,9 A | * | ns | * |
| | CTC | mmolc dm ⁻³ | 112 ± 35,6 | 128,6 ± 4,2 | 119,5 ± 35,4 | 131,0 ± 8,7 | 70,2 ± 6,1 B | 80,5 ± 1,6 AB | 82,7 ± 2,4 A | * | ns | * |
| V | % | 5,5 ± 2,0 | 85,0 ± 1,3 | 73,0 ± 28,2 | 85,2 ± 0,7 | 75,3 ± 0,6 AB | 69,2 ± 10,6 B | 85,9 ± 1,1 A | * | ns | ns | |
| Micro - nutrientes | B | mg dm ⁻³ | 0,6 ± 0,1 a | 0,4 ± 0,1 ab | 0,3 ± 0,1 b | 0,3 ± 0,0 ab | 0,2 ± 0,1 | 0,3 ± 0,0 | 0,3 ± 0,0 | * | ns | ns |
| | Cu | mg dm ⁻³ | 0,3 ± 0,0 | 0,5 ± 0,3 | 1,6 ± 2,1 | 0,5 ± 0,2 | 0,5 ± 0,0 | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | ns | ns | ns |
| | Fe | mg dm ⁻³ | 210,8 ± 12,1 a | 23,3 ± 6,8 bc | 21,6 ± 8,9 c | 54,0 ± 1,7 ab | 24,8 ± 5,5 | 52,5 ± 48,1 | 24,0 ± 3,5 | ns | ns | * |
| | Mn | mg dm ⁻³ | 1,9 ± 0,6 | 2,5 ± 0,6 | 2,8 ± 0,4 | 2,1 ± 1,4 | 2,3 ± 0,5 | 3,0 ± 0,8 | 1,6 ± 0,3 | ns | ns | ns |
| | Zn | mg dm ⁻³ | 0,2 ± 0,1 b | 4,3 ± 1,9 a | 2,7 ± 0,6 a | 2,1 ± 0,2 ab | 5,1 ± 0,5 A | 2,6 ± 0,6 AB | 2,1 ± 0,2 B | ns | ns | ns |

Em cada linha, os resultados apresentados correspondem às médias e aos desvios dos parâmetros químicos analisados para cada área de estudo. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas de Agricultura e Floresta Primária (Agr. 2 x Agr. 5 x Agr. 20 x FP). Letras maiúsculas representam a comparação entre Rizosferas (Riz. 2 x Riz. 5 x Riz. 20). (*) representam diferença estatística e (ns) diferença não significativa, entre Agr. e Riz. dentro do mesmo ano pelo teste de Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

5.2 Sequenciamento em larga escala

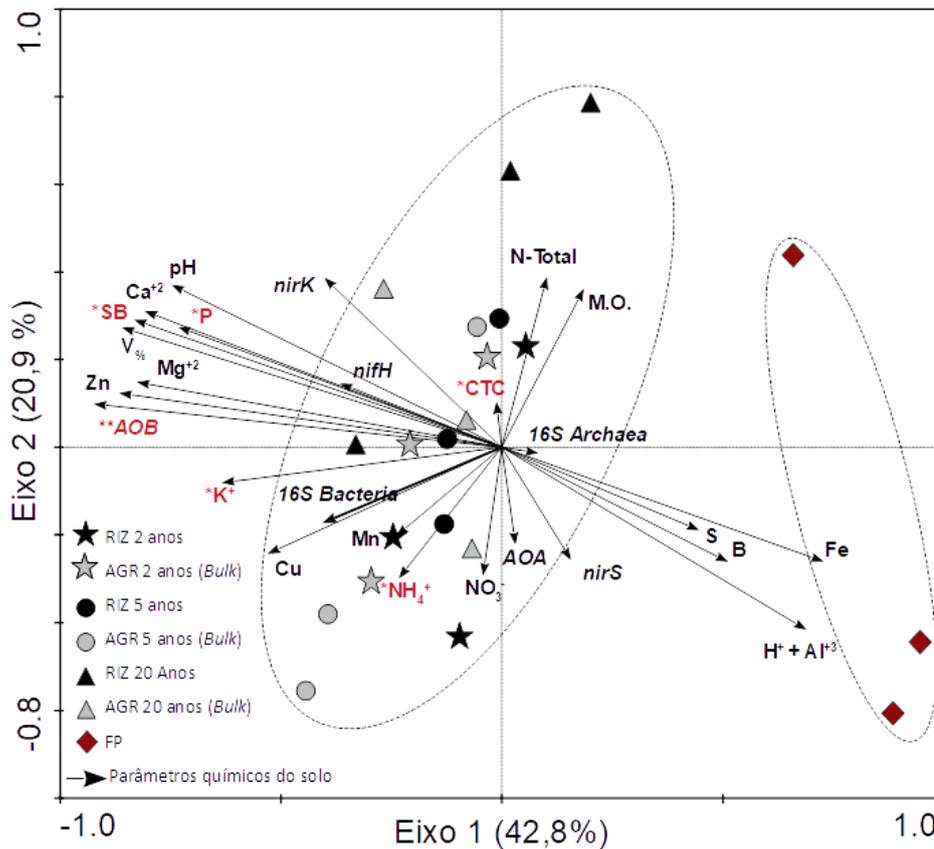
O sequenciamento em larga escala dos genes *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea* foram realizados com o objetivo de determinar os índices de diversidade e perfis taxonômicos dessas comunidades em solos de AGR, RIZ e FP. A curva de rarefação das amostras sequenciadas de *Bacteria* foi construída considerando uma amostragem aleatória de 50000 sequências (Figura S1 – Material suplementar), enquanto que a curva de rarefação de *Archaea* foi construída com uma amostragem aleatória de 88000 sequências (Figura S2 – Material suplementar). Informações adicionais sobre o sequenciamento após o processamento de qualidade, utilizando a sequência *forward* dos genes *16S rRNA* de *Bacteria* e *Archaea*, podem ser observadas na Tabela S1 (Material suplementar).

5.2.1 Análise da estrutura e diversidade de *Bacteria*

A Figura 4 representa a análise de redundância (RDA) realizada a partir dos gêneros de bactérias, abundância de genes marcadores e parâmetros químicos do solo. Os eixos 1 e 2 da RDA explicaram 42,8 e 20,9% respectivamente, da variação total na abundância relativa dos gêneros de bactérias. A análise revela um agrupamento entre as amostras dos solos agrícolas (AGR) e solos rizosféricos (RIZ), além de uma segregação do solo de FP em relação aos demais ambientes ($P < 0,01$). Os principais parâmetros químicos do solo responsáveis pela distribuição das amostras foram: SB ($p = 0,02$), P ($p = 0,02$), K^+ ($p = 0,02$), NH_3^+ ($p = 0,02$), CTC ($p = 0,04$) e o gene AOB ($p < 0,01$).

Os resultados sugerem que ambientes com maior disponibilidade de nutrientes, como solos de AGR e RIZ por exemplo, influenciam a estrutura de comunidades bacterianas do solo favorecendo diferentes grupos dos observados no solo de FP. A ligação entre a disponibilidade de nutrientes e a distribuição de bactérias no solo pode estar relacionado ao estilo de vida copiotrófico exercido por alguns grupos de bactérias que são favorecidos em solos de agricultura (LEFF et al., 2015).

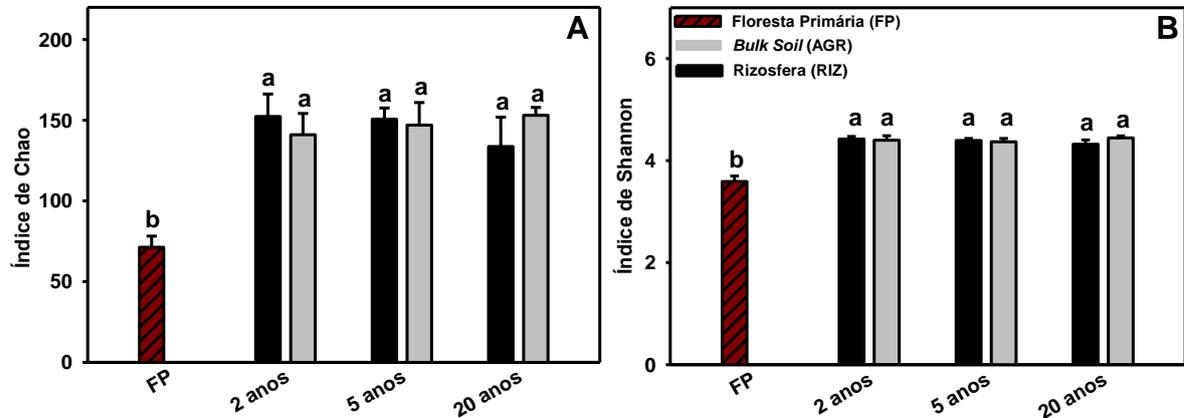
Figura 4 – Análise de redundância (RDA) realizada a partir de gêneros de bactérias, abundância de genes marcadores e dos parâmetros químicos em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. As setas indicam correlação entre a abundância de genes e os parâmetros químicos do solo. (*) indicam correlações significativas baseado no teste de permutação de Monte Carlo a 5% de significância. Agrupamentos significativos são



indicados por linhas tracejadas no gráfico baseado no teste PERMANOVA a 5% de significância.

Na Figura 5, observa-se os resultados para os índices de diversidade de Chao (A) e Shannon (B) para bactérias em solos de agricultura, floresta primária e solos rizosféricos sob influência de uso do solo ao longo do tempo. Não foi verificada diferença entre os solos de agricultura e solos rizosféricos. Entretanto, o solo de FP apresentou uma menor diversidade de bactérias quando comparado com os demais ambientes ($P < 0,01$). Mendes et al., (2015) também avaliaram a diversidade de bactérias em solos amazônicos e verificaram uma alta diversidade e redundância funcional de bactérias em solos de áreas de agricultura, e relacionaram essas características a manutenção do funcionamento desses ecossistemas após a conversão da floresta. Além disso, os mesmos autores sugerem que ecossistemas em equilíbrio, como solos de floresta por exemplo, são mantidos por uma menor diversidade e uma maior abundância de micro-organismos.

Figura 5 – Índices de diversidade de Chao (A) e Shannon (B) de bactérias encontrados em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo.



Barras com diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.2.2 Composição das comunidades de *Bacteria*

A Figura 6 representa a abundância relativa dos filos de *Bacteria* em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. A presença e representatividade dos filos do domínio *Bacteria* verificados no presente estudo, já foram descritos em diversos trabalhos em solos amazônicos (RODRIGUES et al., 2013; MENDES et al., 2015). De modo geral, verifica-se que os filos que apresentaram maior abundância relativa nos ambientes avaliados foram os de Proteobacteria (24%), Actinobacteria (22%), Acidobacteria (14%) e Chloroflexi (11%). No presente estudo, os filos Proteobacteria e Actinobacteria mostraram ser uma grande parte da comunidade microbiana do solo e a predominância desses dois grupos pode ser devido a maior disponibilidade de nutrientes que é verificada em solos de AGR e RIZ. Esses dois grupos de micro-organismos abrigam uma grande diversidade de copiotróficos, ou seja, micro-organismos que tem seu crescimento favorecido em ambientes com alta disponibilidades de nutrientes (DAI et al., 2018), como é verificado em solos de AGR e RIZ.

O filo Proteobacteria, abriga uma grande diversidade de micro-organismos, e muitos de seus representantes já foram relacionados ao ciclo do N como oxidantes de nitrito, oxidantes de amônia e fixadores de N (STEIN; KLOTZ et al., 2016; FRANCHE; LINDSTRON; ELMERICH, 2009).

O filo Actinobacteria é descrito como um dos mais abundantes em diversos tipos de solo, especialmente em alcalinos e ricos em matéria orgânica (BARKA et al., 2016), como pode ser observado nos solos de agricultura e rizosfera avaliados neste estudo ($P < 0,01$), e também possui membros relacionados a fixação de N (FRANCHE; LINDSTRON; ELMERICH, 2009).

A predominância de Acidobacterias em solos tropicais, foi verificada por KIM et al., 2007. No entanto, no presente estudo o filo foi o 3º mais abundante, o que pode estar relacionado com a preferência desse grupo de micro-organismos por ambientes com menor disponibilidade de nutrientes e comportamento oligotrófico tido por muitos de seus integrantes (LEFF et al., 2015). A aplicação de fertilizantes em áreas de agricultura, como N, e a elevação do pH pode inibir o desenvolvimento de Acidobacterias, devido sua preferência por ambientes mais ácidos e pobres em nutrientes (DAI et al., 2018).

O 4º filo mais abundante no presente estudo foi o Chloroflexi, que já foi verificado em solos rizosféricos (BULGARELLI et al., 2012), e parecem ser influenciados pelo conteúdo de N orgânico e pH em áreas agrícolas (ORR et al., 2015).

A estrutura da comunidade bacteriana de FP mostrou ser diferente das áreas de AGR e RIZ. Os filios Clamydiae, Thermotogae e WD272 corresponderam a 0,5%, 0,1 e 0,2% do total de bactérias, e apresentaram maior abundância no solo de FP ($P < 0,05$). O filo Clamydiae é descrito por abrigar micro-organismos responsáveis por parasitar eucariotos como minhocas e amebas (REAVY et al., 2015). Já o filo Thermotogae é caracterizado por abrigar micro-organismos que podem metabolizar uma infinidade de substratos orgânicos (BHANDARI et al., 2014), enquanto que o filo WD272, que possui poucas informações na literatura, já foi encontrado em ambientes com baixo pH (SOUZA, 2016).

A estrutura das comunidades de bactérias verificadas em solos de AGR e RIZ apresentaram pequenas segregações. Os solos RIZ 5 e 20 anos mostraram-se mais próximos quando comparados com as demais áreas. A RIZ 2 anos apresentou uma estrutura de bactérias mais próxima das áreas de AGR do que das demais rizosferas. Já os solos de AGR com 2, 5 e 20 anos, apresentaram estruturas de comunidades de bactérias mais próximas.

O filo Firmicutes correspondeu a 5,2% da abundância relativa de bactérias nos solos avaliados, com maior abundância nos solos de RIZ 5, AGR 5 e AGR 20 anos ($P = 0,02$). Os Bacteroidetes e Gemmatimonadetes corresponderam a 2 e 2,3% da abundância relativa total e apresentaram maior abundância em todos os solos avaliados com exceção do solo de FP ($P = 0,01$). A presença dos três filios já foi descrita em áreas de agricultura,

e parecem ser comunidades responsivas às práticas agrícolas como inoculação e diferentes manejos do solo (ISHAQ et al., 2017; BAKKER et al., 2015).

O filo Candidate division TM7 apresentou abundância relativa de 1,1%, mostrando ser uma pequena parte da comunidade bacteriana do solo. O filo apresentou diferença entre os ambientes avaliados, estando presente em maior abundância nos solos de rizosfera e áreas de agricultura ($p < 0,01$). A presença do filo no solo já foi relacionada com a degradação de substâncias não bio-degradáveis e materiais pesados (NAM et al., 2016; MEEBOON et al., 2017).

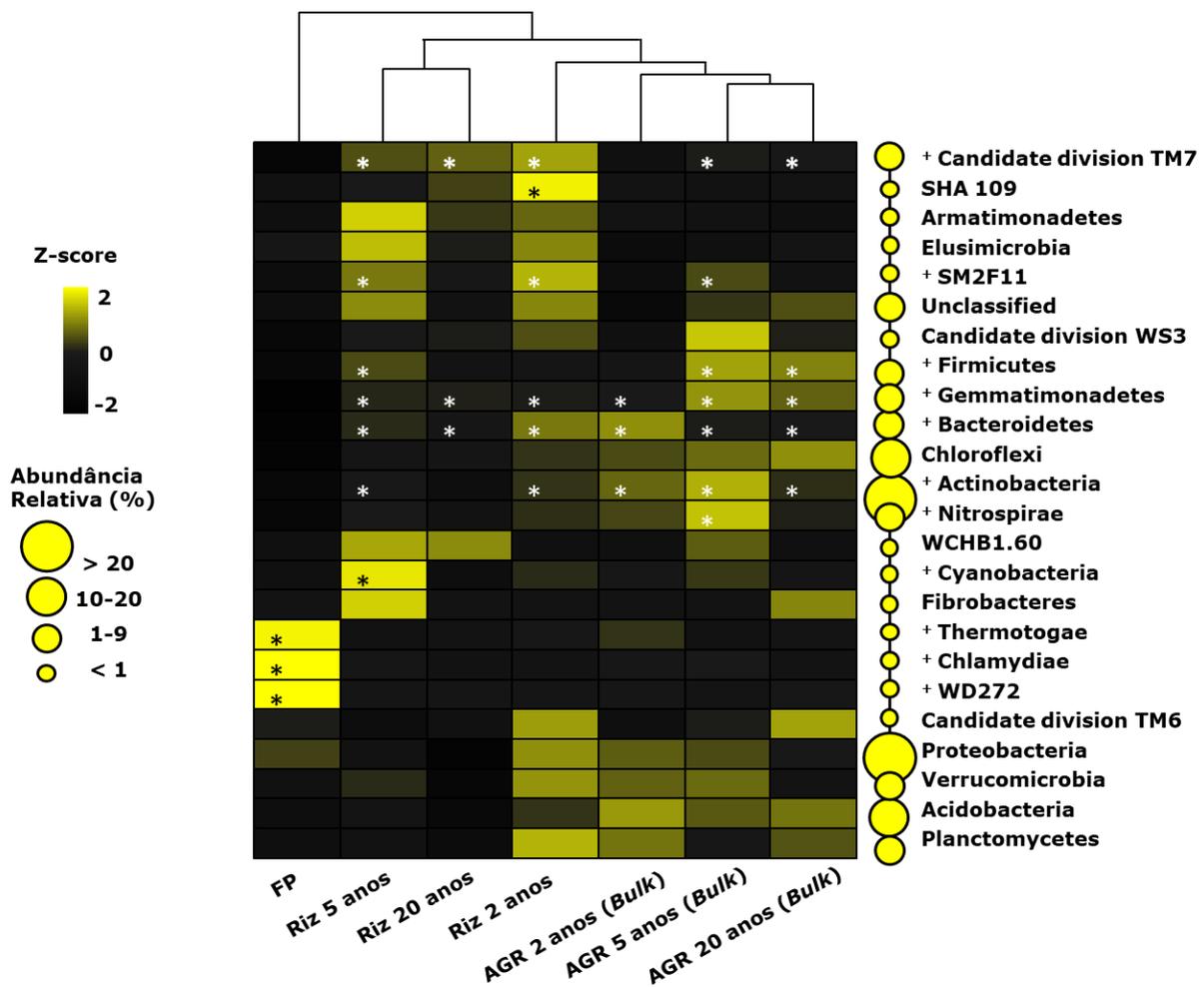
A abundância do filo Nitrospirae correspondeu a 1% da comunidade total de bactérias, com maior abundância no solo de AGR. 5 anos ($P < 0,01$). A presença do filo já foi observada em áreas de agricultura na região amazônica (MENDES et al., 2015). O filo é caracterizado por abrigar bactérias oxidantes de amônia, responsáveis pela segunda etapa da nitrificação, na conversão do nitrito para nitrato (ATTARD et al., 2010).

O filo Cyanobacteria correspondeu a 0,5% da comunidade de bactérias, com maior abundância na RIZ 5 anos ($P < 0,01$). O filo abriga bactérias caracterizadas por fixar N e ter um curto tempo de geração (SINGH et al., 2016).

O filo bacteriano SMSF11 obteve abundância relativa de 0,1% nos solos avaliados. O solo AGR de 5 anos e as RIZ 2 e 5 anos apresentaram uma maior abundância do filo ($P = 0,05$). Micro-organismos relacionados a este filo já foram verificados em ambientes como terra preta da China e solos de agricultura com sistema de cultivo semelhante ao plantio direto (LIU et al., 2014; YANG et al., 2017).

A abundância do filo SHA-109 correspondeu a menos de 0,01% da abundância relativa da comunidade bacteriana do solo. A RIZ 2 anos apresentou maior abundância relativa do filo ($P < 0,01$) e não foram encontradas muitas informações a respeito do mesmo.

Figura 6 – *Heatmap* exibindo a diferença de abundância entre os filios de bactérias encontrados em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. (+) indicam quais os filios que apresentaram diferença na abundância de sequências e (*) indicam quais as áreas que apresentaram maior abundância dentro de cada filio (teste de Kruskal Wallis a 5% de significância). As tonalidades de cores estão relacionadas com a abundância relativa de cada filio entre as áreas avaliadas, calculadas através do z-score. Os círculos são proporcionais à abundância relativa de cada filio em todas as amostras.



Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a área de FP apresentou uma segregação das amostras em relação aos demais ambientes, uma menor diversidade de bactérias e diferente estrutura de comunidades bacterianas quando comparada com os solos de AGR e RIZ. Por outro lado, os solos de AGR E RIZ mostraram ter estruturas de bactérias bem semelhantes, além de não apresentarem diferenças nas análises de redundância e índices de diversidade.

De forma geral, as análises sugerem que as comunidades bacterianas presentes em solos de FP, AGR e RIZ respondem fortemente ao efeito da mudança de uso da terra, independentemente do tempo de uso desses solos. As diferenças observadas parecem estar fortemente relacionadas com os parâmetros químicos do solo, que são alterados com a conversão de áreas de floresta para áreas de exploração agrícola.

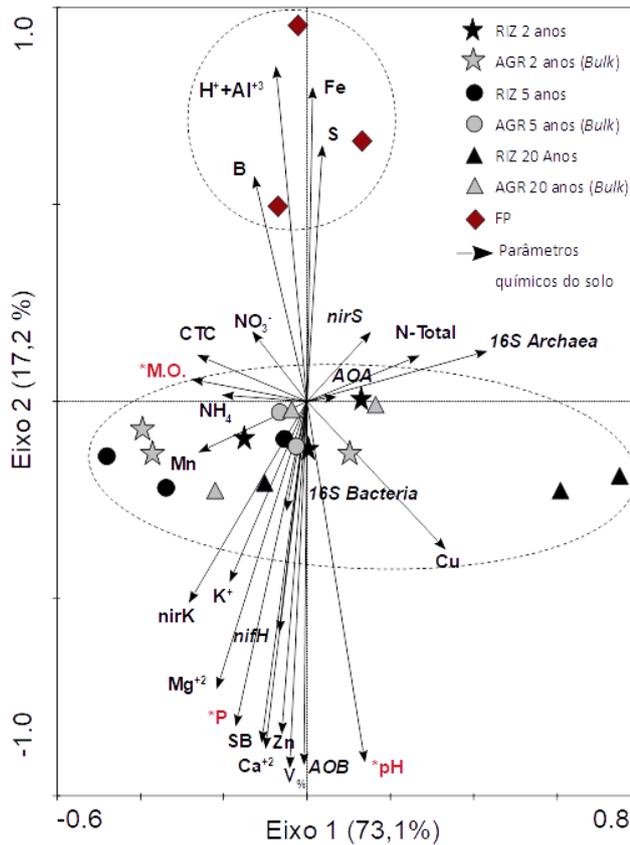
5.2.3 Análise da estrutura e diversidade de *Archaea*

Na Figura 7 observa-se a análise de redundância (RDA) realizada à partir dos gêneros de arqueias, abundância de genes marcadores e parâmetros químicos do solo. Os eixos 1 e 2 da RDA explicaram 73,1 e 17,2% respectivamente, da variação total na abundância relativa dos gêneros de arqueias. Verificou-se ainda que as amostras de solo de RIZ e AGR apresentaram distribuição semelhante, segregando-se apenas das amostras de FP ($P < 0,01$). Os principais parâmetros responsáveis pela distribuição das amostras foram M.O. ($p = 0,03$), P ($p = 0,04$) e pH ($p = 0,04$).

A relação de comunidades de arqueias do solo com parâmetros químicos como matéria orgânica e fósforo, ainda é pouco elucidada. Siles et al. (2017) avaliaram a influência da matéria orgânica em comunidades de arqueias do solo e não observaram correlações entre as duas variáveis, sugerindo que as alterações nessas comunidades podem estar mais relacionadas com variações nas condições ambientais e competição por recursos com outros domínios microbianos. Wu et al. (2017) verificaram que a aplicação de P alterou a concentração de nutrientes no solo, o que refletiu em uma maior abundância de arqueias e bactérias no solo.

O pH parece estar diretamente relacionado com a abundância de comunidades de arqueias em diversos solos. Gun et al. (2016) verificaram que comunidades de arqueias oxidantes de amônia correlacionaram-se positivamente com pH e negativamente com P disponível, em solos de floresta sub-tropical. Segundo os mesmos autores, a preferência de arqueias por ambientes com baixo pH está relacionada a baixa concentração da amônia verificada em solos ácidos, o que contribui para o desenvolvimento de arqueias oxidantes de amônia. Já o conteúdo de P parece influenciar negativamente comunidades de arqueias do solo devido a preferência desse grupo de micro-organismos por ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes ou estilo de vida oligotrófico.

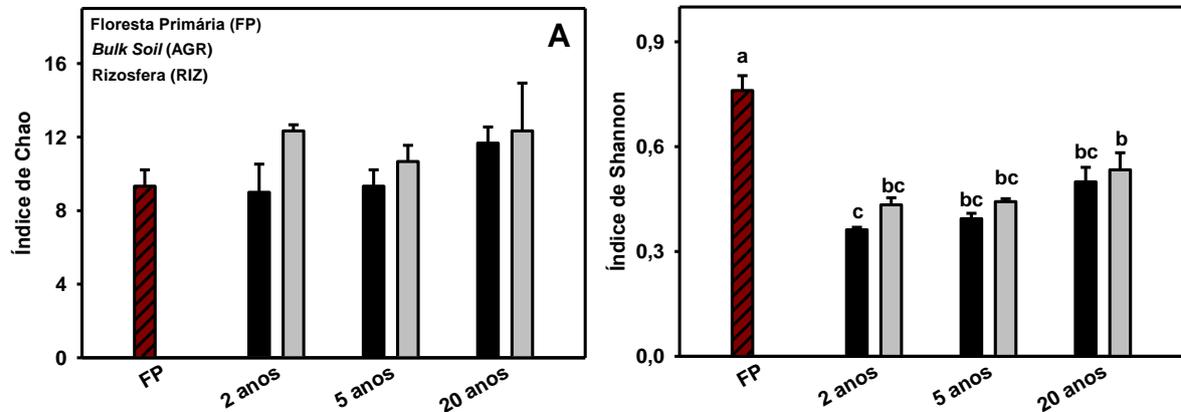
Figura 7 – Análise de redundância (RDA) realizada a partir de gêneros de arqueias, abundância de genes marcadores e dos parâmetros químicos em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. As setas indicam correlação entre a abundância de genes e os parâmetros químicos do solo. (*) indicam correlações significativas baseado no teste de permutação de Monte Carlo a 5% de significância. Agrupamentos significativos são indicados por linhas tracejadas no gráfico baseado no teste PERMANOVA a 5% de significância.



Com relação à diversidade de arqueias, verifica-se que o solo de FP apresentou um maior valor para o índice de Shannon (Figura 8B) quando comparado com os demais solos de agricultura e rizosfera ($p < 0,01$). O solo de AGR 20 anos apresentou um maior índice de Shannon quando comparado com a RIZ 2 anos ($p < 0,01$). Não foram verificadas diferenças para o índice de Chao em nenhum dos ambientes avaliados.

A maior diversidade de arqueias observada na área de floresta primária pode estar relacionada com o baixo valor de pH encontrado nesses solos. Tripathi et al. (2013) avaliaram solos de floresta tropical e associaram a maior abundância e riqueza de arqueias ao baixo pH verificado nessas áreas. Os mesmos autores verificaram uma diminuição da abundância de arqueias com a elevação do pH, evidenciando que este fator desempenha um papel importante na estruturação de comunidades de arqueias em solos de florestas tropicais.

Figura 8 – Índices de diversidade de Chao (A) e Shannon (B) de arqueias encontrados em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. Barras com diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância.

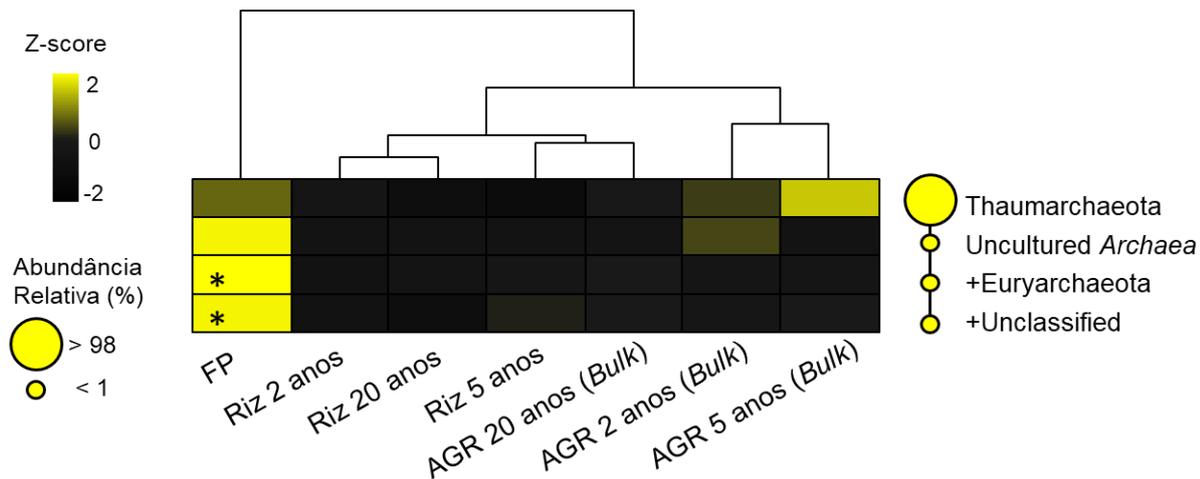


5.2.4 Composição das comunidades de *Archaea*

A Figura 9 representa a abundância relativa dos filos de *Arqueias* em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. Verificou-se que o filo dominante em todos os ambientes avaliados foi o de Thaumarchaeota com mais de 98% da abundância relativa de sequências. A estrutura da comunidade de arqueias do solo de FP mostrou ser diferente dos demais solos ($p < 0,01$). A área de FP apresentou uma maior abundância relativa dos filos de Euryarchaeota ($p < 0,01$) e UTOs (Unidades Taxômicas Operacionais) não classificadas ($p < 0,01$). As comunidades de arqueias presente em solos de agricultura e rizosfera apresentaram agrupamentos entre si. Os solos AGR 2 e 5 anos mostraram estruturas mais semelhantes. Entretanto, a comunidade bacteriana presente nos solos rizosféricos e no solo AGR 20 anos mostraram-se mais próximos. No presente estudo verificou-se a predominância do filo Thaumarchaeota (>98%) em todos os ambientes avaliados. O filo é considerado um dos mais abundantes do domínio *Archaea*, abrigando principalmente arqueias oxidantes de amônia, além de outros micro-organismos com metabolismo de energia desconhecida (PESTER et al., 2011).

O filo Euryarchaeota correspondeu a menos de 1% das sequências observadas, e apresentou maior abundância no solo de Floresta Primária. O filo já foi verificado em solos de floresta e é conhecido por abrigar micro-organismos que habitam diversos tipos de ambientes, micro-organismos com propriedades metabólicas não definidas e gêneros responsáveis pela produção de gases de efeito estufa (PESARO; WIDMER, 2002; LIU; WHITMAN, 2008; HU et al., 2013).

Figura 9 – *Heatmap* exibindo a diferença de abundância entre os filios de arqueias encontrados em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. (+) indicam quais os filios que apresentaram diferença na abundância de seqüências e (*) indicam quais as áreas que apresentaram maior abundância dentro de cada filio (teste de Kruskal Wallis a 5% de significância). As tonalidades de cores estão relacionadas com a abundância relativa de cada filio entre as áreas avaliadas, calculadas através do z-score. Os círculos são proporcionais à abundância relativa de cada filio em todas as amostras.



Não foi verificado influência do uso do solo ao longo do tempo nas comunidades de arqueias no presente estudo. As principais alterações observadas parecem estar relacionadas com alterações do pH do solo, que é consequência da conversão de áreas de floresta para áreas de agricultura.

5.3 Abundância de genes relacionados ao ciclo do N

A metodologia foi realizada com o uso de uma curva padrão para cada gene avaliado (Tabela 2). As curvas padrões apresentaram coeficiente de correlação acima de $r^2 = 0,90$ e eficiência acima de 90%. Em relação a quantidade de DNA extraída dos solos avaliados, realizou-se a padronização de todas as amostras e o valor final das quantificações foram expressas em N° de cópias do DNA por grama de solo.

A Figura 10 representa a abundância de genes marcadores filogenéticos e funcionais associados ao ciclo do N presentes em solos de agricultura sem a influência de raízes (AGR - *Bulk soil*) e solo rizosférico (RIZ), ambos sob efeito de uso da terra ao longo do tempo, e como comparativo, solo de floresta nativa ou floresta primária (FP).

A abundância do gene *16S rRNA de Bacteria* (Figura 10A) foi maior no solo AGR 2 anos ($5,11 \times 10^{10}$), quando comparado com os solos de RIZ 2, 5 e 20 anos e FP ($1,22$, $1,57$, $2,03$ e $1,60 \times 10^{10}$ respectivamente) ($P < 0,01$). Foi observado uma tendência em que o número de

cópias do gene 16S bacteriano foi maior nos solos controles (AGR), independentemente do tempo de uso do solo. Essa tendência pode ser explicada pelo fato de que a comunidade microbiana de bactérias presente em raízes é submetida a uma “seleção” pela planta a partir da biodiversidade presente no bulk soil, ou solo não rizosférico. O recrutamento de micro-organismos executado pelas raízes de plantas pode resultar em uma menor abundância e menor diversidade na rizosfera (MENDES et al., 2014). A maior abundância de bactérias observada na área agrícola de 2 anos pode estar relacionada com a maior disponibilidade de nutrientes observada nessas áreas (Tabela 4). Navarrete et al. (2015) verificaram que a fertilidade do solo pode atuar como um fator preponderante em comunidades bacterianas do solo.

O número de cópias do gene *16S rRNA de Archaea* (Figura 10B) foi maior no AGR 2 anos ($1,53 \times 10^8$) e na RIZ 20 anos ($1,61 \times 10^8$) quando comparados com a RIZ 5 anos ($4,57 \times 10^7$) ($P=0,02$). A variação observada pode ser atribuída ao comportamento generalista das arqueias, cuja ecologia é dependente da concentração de N, estado da matéria orgânica, presença de raízes ou presença e abundância de outros organismos (DONG et al., 2015).

Para o gene *amoA de Bacteria* (Figura 10C), o número de cópias foi maior nos solos AGR 2, 5 e 20 anos ($2,11$, $2,13$ e $2,28 \times 10^5$, respectivamente) e RIZ 5 anos ($1,68 \times 10^5$), quando comparados com o solo de FP ($3,84 \times 10^3$) ($P=0,01$). A maior abundância do gene em áreas agrícolas pode estar relacionada aos maiores valores de fertilidade e pH do solo que são encontrados em áreas de cultivo (Tabela 4) e que pode favorecer as bactérias oxidantes de amônia (AOB) (STERNNGREN, HALLIN, BENGTON, 2015; GUO et al., 2017).

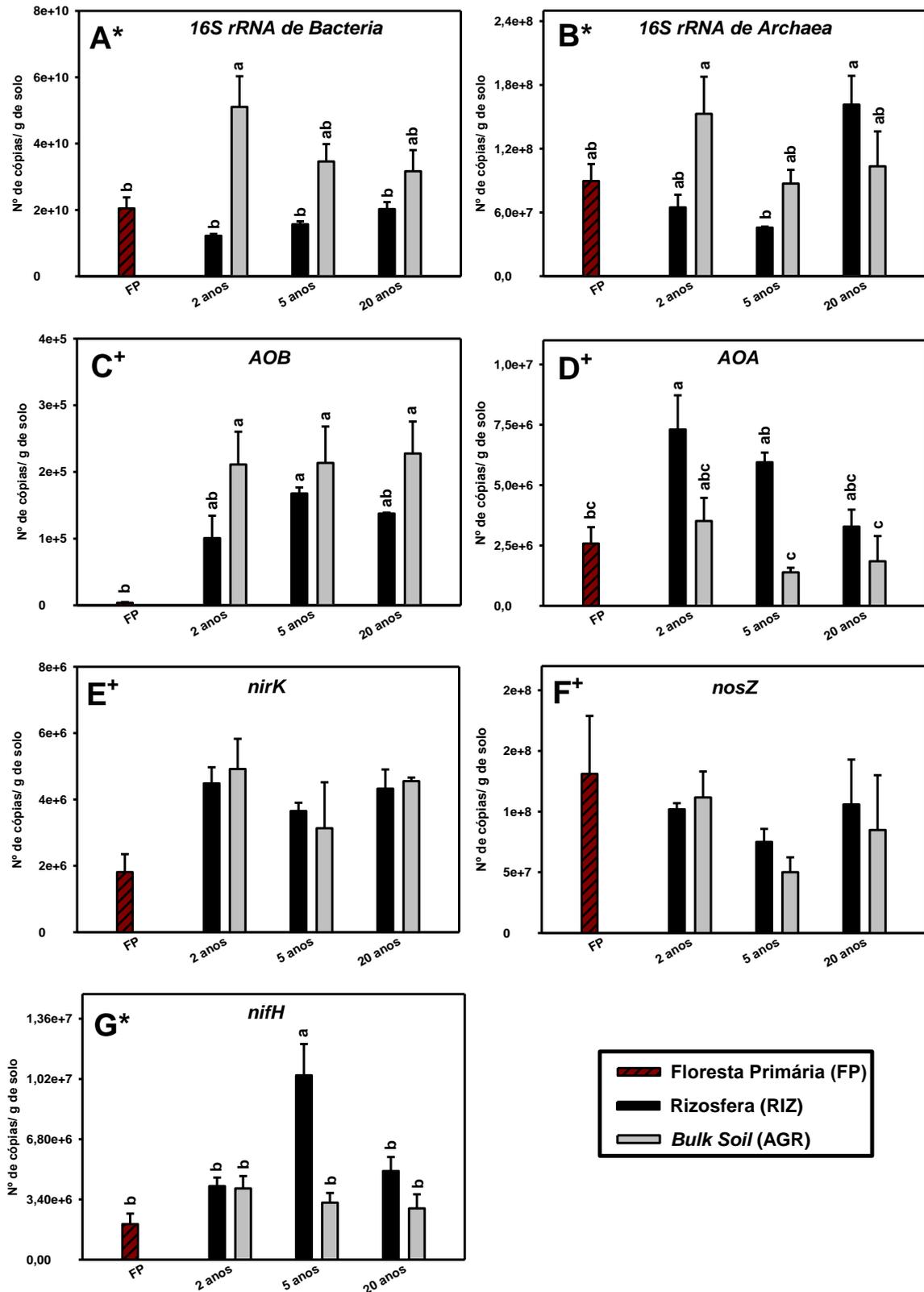
A abundância do gene *amoA de Archaea* (Figura 10D), de forma geral, foi maior em ambientes rizosféricos em relação aos controles e solo de floresta nativa. O número de cópias do gene *amoA de Archaea* nos solos RIZ 2 e 5 anos ($7,30 \times 10^6$ e $5,95 \times 10^6$ respectivamente) apresentaram maiores valores que os solos AGR 5 e 20 anos ($1,39 \times 10^6$ e $1,85 \times 10^6$ respectivamente) ($P=0,01$). A predominância de arqueias oxidantes de amônia em ambientes rizosféricos pode estar diretamente relacionada com a disponibilidade de amônio no solo. Segundo Prosser e Nicol (2012), arqueias oxidantes de amônia possuem uma alta afinidade por amônia e podem ser inibidas em ambientes com alta concentração da mesma. No presente estudo a quantidade de amônio em solo rizosférico foi baixo quando comparado com os solos controles (Tabela 4), o que pode ter criado um ambiente com condições ótimas para o desenvolvimento desse grupo de micro-organismos.

Verifica-se ainda que o número de cópias do gene *AOA* (Figura 10D), foi maior quando comparado com o número de cópias do gene *AOB* (Figura 10C), sugerindo que o processo de oxidação da amônia, mediada por esses dois grupos de micro-organismos, pode ter sido conduzido majoritariamente por arqueias, nas condições do presente estudo. Segundo Prosser e Nicol (2012), a afinidade pela amônia, estilo de vida mixotrófico e pH tem sido sugeridos como fatores responsáveis pela especialização de nicho e diferenciação entre os micro-organismos oxidantes de amônia no solo. Diversos autores observaram uma predominância *AOA* sobre *AOB*, principalmente em solos com alta acidez (GUBRY-RANGIN, NICOL, PROSSER, 2011; CATÃO et al., 2016). A enzima amônia mono-oxigenase em arqueias possui uma maior afinidade por substrato quando comparada com a mono-oxigenase análoga presente em bactérias. Por isso, tem sido sugerido que a abundância de *AOA* predomina sobre *AOB*, em condições em que a concentração de amônia é particularmente baixa. Essa relação parece ocorrer devido o estilo de vida oligotrófico das arqueias oxidantes de amônia, ou sua preferência por ambientes com uma baixa quantidade de nutrientes (HATZENPICHLER et al., 2008; WALKER et al., 2010; ZHALNINA et al., 2012).

A abundância dos genes participantes do processo de desnitrificação (Figura 10E e F) não apresentaram diferenças entre os ambientes avaliados. Entretanto, os genes *nirK* e *nosZ* apresentaram uma abundância com escala de 10^8 cópias por grama de solo, sugerindo que esses dois grupos de micro-organismos compõem uma grande parte da comunidade microbiana do solo.

O número de cópias do gene *nifH*, presente em micro-organismos fixadores de N, foi maior na rizosfera de 5 anos em relação aos demais tratamentos ($P < 0,01$). Vale ressaltar que o solo de agricultura de 5 anos possuía plantas de soja quando foi coletado. A presença de plantas de soja sob o solo pode ter influenciado na abundância de micro-organismos fixadores de N que são recrutados pela rizosfera, refletindo em uma maior abundância desses micro-organismos na rizosfera da área de 5 anos. Mirza et al. (2014) verificaram que as comunidades de plantas sobre o solo têm forte influência nos micro-organismos diazotróficos. Os mesmos autores sugerem que os micro-organismos fixadores de N são recrutados afim de atender a demanda de N necessária para o desenvolvimento das plantas.

Figura 10 – Abundância dos genes marcadores filogenéticos *16S rRNA de Bacteria* (A) e *16S rRNA de Archaea* (B) e abundância de genes funcionais associados ao ciclo do N, *amoA de Bacteria – AOB* (C), *amoA de Archaea – AOA* (D), *nirK* (E), *nosZ* (F) e *nifH* (G), em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. Barras seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (+) ou Tukey (*), a 5% de probabilidade.



5.3.1 Correlação entre parâmetros químicos do solo e qPCR

A Tabela 5 apresenta valores para correlação de Spearman entre a abundância de genes filogenéticos e funcionais e parâmetros químicos do solo.

O gene *16S rRNA de Bacteria* mostrou correlação positiva com os parâmetros NH_3^+ , NO_3^- , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , SB e CTC. Os resultados sugerem que uma maior abundância de bactérias no solo pode estar correlacionada positivamente com ambientes ricos em nutrientes. As áreas de agricultura avaliadas no presente estudo apresentaram uma maior fertilidade do solo quando comparadas com a área de floresta (Tabela 4), o que pode ter proporcionado uma maior abundância de bactérias no solo (Figura 10A). Jeanbille et al. (2016), observaram correlações positivas entre bactérias e parâmetros químicos do solo como N total, Ca^{+2} e CTC. Os mesmos autores também observaram que a disponibilidade de nutrientes determinou a distribuição de comunidades microbianas no solo, o que também pode ter ocorrido no presente estudo.

O gene *16S rRNA de Archaea* mostrou correlação positiva com a M.O. do solo e correlação negativa com Mn. A correlação positiva de arqueias com a matéria orgânica pode estar relacionada ao crescimento mixotrófico que alguns grupos de arqueias podem exercer (LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2014). Enquanto que a correlação negativa do Mn com a abundância do gene *16S rRNA de Archaea* pode estar relacionada a ação tóxica desse elemento em alguns grupos de arqueias no solo (XIN et al., 2016).

O gene *amoA de Bacteria*, mostrou correlação positiva com os parâmetros P, K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , SB, V, Cu e Zn, sugerindo a preferência desse grupo de micro-organismos por ambientes onde existam uma maior fertilidade e disponibilidade de cátions trocáveis. Na Figura 10C observou-se um maior número de cópias de bactérias oxidantes de amônia nas áreas de agricultura, que são ambientes que apresentam maior fertilidade do solo quando comparados com o ambiente de floresta primária (Tabela 4). A correlação positiva do gene *AOB* com os parâmetros químicos observados, reforçam a ideia da preferência desse grupo de bactérias por ambientes ricos em nutrientes. Song et al. (2013) também observaram uma maior abundância do gene *AOB* em ambientes com maior disponibilidade de nutrientes, sugerindo um estilo de vida copiotrófico para esse grupo de bactérias.

A abundância do gene *AOA* mostrou correlação negativa com NO_3^- e CTC, e correção negativa com os parâmetros NH_3^+ , M.O. e S. Os resultados reforçam a hipótese de que ambientes com alta concentração de amônia podem inibir o processo de nitrificação por arqueias. A correlação negativa com a M.O. pode estar relacionada com a sua decomposição e posterior liberação de amônio e nitrato, que nas condições desse experimento, parece ter

influenciado de forma negativa nas comunidades de AOA. A alta CTC em solos tropicais pode indicar ambientes com uma menor acidez, o que pode ser desfavorável para AOA, considerando sua preferência por ambientes com menor pH (GUBRY-RANGIN et al., 2011). A correlação negativa com S pode indicar uma sensibilidade dos micro-organismos oxidantes de amônia à presença do elemento. Uma alta concentração de S pode resultar na total inibição do processo de oxidação da amônia (SEARS et al., 2004).

O gene *nifH*, apresentou correlação negativa com a M.O., S, H^+Al^{+3} e CTC, correlação negativa com B e Fe e correlação moderada positiva com pH. Os dados sugerem que a presença de micro-organismos fixadores de N está correlacionada com ambientes mais alcalinos, baixa capacidade de troca catiônica, menor conteúdo de ferro, boro e enxofre (reflexo da acidez do solo). Mirza et al. (2014) observaram a correlação entre a acidez potencial e a abundância do gene *nifH*, evidenciando a preferência desse grupo de micro-organismos por ambientes mais alcalinos.

A abundância do gene *nirK* apresentou correlação negativa com S, H^+Al^{+3} e Fe e correlação positiva com os parâmetros P, K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , V. Os resultados mostram uma maior afinidade da comunidade oxidante de NO_2^- por ambientes com uma maior disponibilidade de nutrientes e um menor conteúdo de ferro, enxofre e acidez potencial. Ligi et al., (2014) observaram que a abundância de genes desnitrificantes no solo são dependentes de diversos parâmetros químicos do solo, mas principalmente o pH.

Tabela 5 – Resultados para análise de correlação de Spearman entre parâmetros químicos do solo e abundância de genes marcadores filogenéticos e funcionais associados ao ciclo do N

| Parâmetros químicos do solo | | ----- Genes ----- | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| | | <i>16S rRNA Bacteria</i> | <i>AOB</i> | <i>16S rRNA Archaea</i> | <i>AOA</i> | <i>nifH</i> | <i>nirK</i> | <i>nosZ</i> |
| Macro-nutrientes | N-total | -0,19 | -0,16 | 0,00 | -0,10 | -0,20 | -0,14 | 0,11 |
| | NH ₃ ⁺ | 0,70** | 0,18 | 0,08 | -0,49* | -0,37 | 0,09 | 0,04 |
| | NO ₃ ⁻ | 0,85** | 0,37 | 0,20 | -0,61** | -0,36 | 0,08 | -0,08 |
| | pH | -0,30 | 0,19 | 0,04 | 0,31 | 0,49* | 0,41 | -0,13 |
| | M.O. | 0,48* | 0,13 | 0,42* | -0,51* | -0,26 | 0,20 | -0,06 |
| | P | 0,12 | 0,62** | -0,09 | 0,13 | 0,27 | 0,48* | -0,18 |
| | S | 0,43* | -0,21 | 0,15 | -0,50* | -0,48* | -0,44* | 0,04 |
| | K ⁺ | 0,55** | 0,76** | 0,11 | -0,16 | 0,06 | 0,54** | -0,07 |
| | Ca ⁺² | 0,52* | 0,63** | 0,21 | -0,25 | 0,14 | 0,64** | -0,14 |
| | Mg ⁺² | 0,51* | 0,70** | -0,03 | -0,15 | 0,20 | 0,44* | -0,21 |
| | H ⁺ + Al ⁺³ | 0,01 | -0,21 | -0,23 | -0,25 | -0,55** | -0,56** | -0,05 |
| | SB | 0,51* | 0,57** | 0,13 | -0,28 | 0,20 | 0,58** | -0,20 |
| | CTC | 0,60** | 0,10 | 0,27 | -0,78** | -0,43* | 0,17 | -0,35 |
| | V (%) | 0,37 | 0,43* | 0,28 | -0,12 | 0,37 | 0,47* | -0,09 |
| Micro-nutrientes | B | 0,37 | -0,19 | 0,15 | -0,41 | -0,60** | -0,28 | 0,16 |
| | Cu | -0,15 | 0,53** | -0,00 | 0,30 | 0,34 | 0,06 | -0,15 |
| | Fe | -0,17 | -0,25 | -0,16 | -0,24 | -0,60** | -0,49* | 0,05 |
| | Mn | -0,08 | 0,24 | -0,61** | 0,02 | 0,08 | -0,19 | -0,37 |
| | Zn | 0,06 | 0,55** | -0,06 | 0,32 | 0,26 | 0,39 | -0,05 |

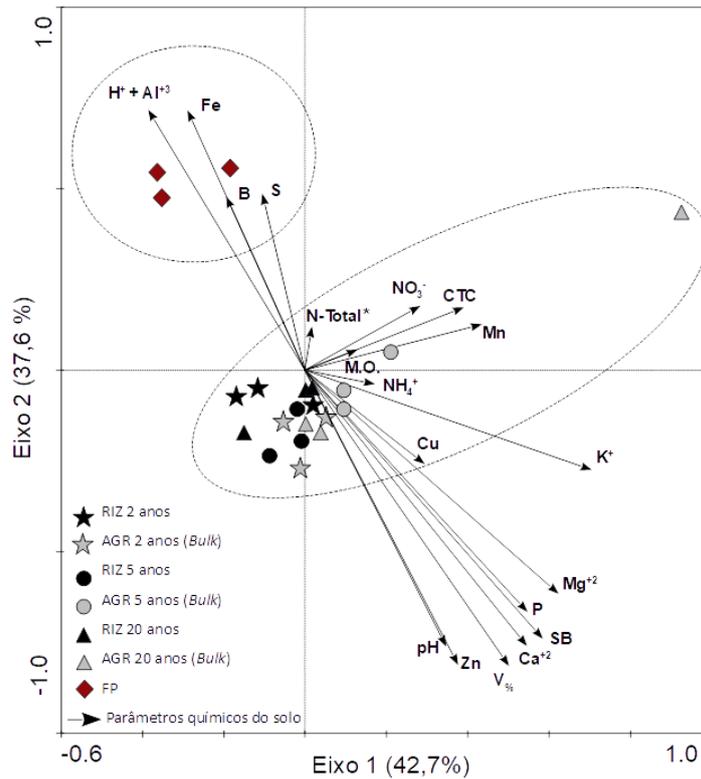
(*) representam correlações significativas (P < 0,05). (**) representam correlações altamente significativas (P < 0,01).

5.3.2 Análise de Redundância (RDA)

A Figura 11 representa a análise de redundância considerando a abundância de genes marcadores e os parâmetros químicos do solo. Os eixos 1 e 2 explicaram 42,7 e 37,6% respectivamente, da variação referente a abundância de genes marcadores nos ambientes avaliados. As amostras de FP apresentaram uma segregação quando comparadas com as amostras de AGR e RIZ (P < 0,001). Por outro lado, as amostras de AGR e RIZ agruparam-se e não foram verificados efeito do uso do solo ao longo do tempo nesses ambientes. Os parâmetros químicos NH₃⁺ (P=0,03), Mn (P=0,01), K⁺ (P < 0,01), pH (P=0,01) e V_% (P < 0,01) foram os principais fatores responsáveis pelos agrupamentos evidenciados na RDA.

Os resultados sugerem a influência da acidez, disponibilidade de N e outros nutrientes na comunidade microbiana funcional do solo.

Figura 11 - Análise de redundância (RDA) realizada a partir da abundância de genes marcadores filogenéticos e funcionais associados ao ciclo do N e dos parâmetros químicos em solos de agricultura, floresta primária e solo rizosférico sob influência de uso do solo ao longo do tempo. As setas indicam correlação entre a abundância de genes e os parâmetros químicos do solo. (*) indicam correlações significativas baseado no teste de permutação de Monte Carlo a 5% de significância. Agrupamentos significativos são indicados por linhas tracejadas no gráfico baseado no teste PERMANOVA a 5% de significância.



De forma geral, as análises mostraram que as áreas de agricultura e rizosfera possuem características semelhantes, e não foi verificado efeito do uso do solo ao longo do tempo na comunidade microbiana funcional desses ambientes. Entretanto, a área de floresta primária se mostrou bem diferente quando comparada com as demais áreas, elucidando o impacto da ação antropogênica sobre ecossistemas naturais, mais especificamente sobre a abundância de genes marcadores filogenéticos e funcionais da microbiota do solo. Vale ressaltar que o conteúdo de N e pH foram os principais parâmetros químicos responsáveis pelas diferenças observadas entre as áreas. A nitrificação mostrou ser o processo do ciclo do N mais influenciado pela mudança de uso do solo e pela presença de raízes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de fertilidade do solo mostraram que as áreas de AGR e RIZ possuem valores semelhantes independente do tempo de uso do solo, apresentando pH mais elevado e maior disponibilidade de nutrientes quando comparados com o solo de FP. O solo de FP por sua vez, mostrou ser um ambiente com baixo pH, alto conteúdo de Fe e S e possuir uma menor disponibilidade de nutrientes.

Verificou-se que não houve efeito do uso do solo ao longo do tempo na estrutura e diversidade das comunidades de bactérias dos solos de AGR e RIZ. De forma geral, os filos bacterianos mais abundantes foram Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi. A distribuição das amostras nesses ambientes mostrou estar relacionada com os parâmetros químicos SB, P, K⁺, NH₃⁺ e CTC. Por outro lado, o solo de FP apresentou diferenças na estrutura e menor diversidade de bactérias quando comparada com os demais solos e apresentou estar mais relacionada com os parâmetros pH, S e Fe. Os perfis taxonômicos das bactérias em solos de AGR e RIZ mostraram ser semelhantes, diferindo apenas da área de FP que parece favorecer diferentes grupos de bactérias dos observados em áreas agrícolas.

Foi verificado que não houve efeito do uso do solo ao longo do tempo nas comunidades de arqueias em solos de AGR e RIZ. De forma geral, a distribuição de arqueias nos ambientes avaliados diferiu apenas na área de FP, que apresentou uma segregação das áreas de AGR e RIZ. Além disso, o solo de FP também apresentou uma maior diversidade de arqueias quando comparada com os demais solos. Os principais parâmetros do solo relacionados a distribuição das amostras foram pH, M.O. e P. Em relação a composição de arqueias, verificou-se a predominância do filo Thaumarchaeota em todos os solos avaliados.

Em relação a abundância de genes relacionados ao ciclo do N, verificou-se que as alterações estão relacionadas fortemente com o conteúdo de N e valor de pH nos solos avaliados. De modo geral, a abundância de bactérias foi maior em áreas de AGR, relacionando-se com parâmetros de fertilidade do solo, indicando que ambientes com maior disponibilidade de nutrientes podem favorecer o desenvolvimento de bactérias no solo. A abundância de arqueias nos solos correlacionou-se positivamente com a M.O., sugerindo um comportamento mixotrófico desse grupo de micro-organismos.

A oxidação da amônia no presente estudo, mostrou ser o processo mais sensível as alterações antropogênicas. A abundância de AOB parece ser favorecida em ambientes com maior disponibilidade de nutrientes, como os solos de AGR, enquanto que a abundância de AOA parecer ser favorecida por ambientes com uma baixa concentração de N disponível, como é o caso dos solos RIZ. Foi verificado um maior número de cópias do gene de *AOA* do que *AOB* nos solos avaliados, indicando a predominância das arqueias sobre a oxidação da amônia em solos tropicais. Genes relacionados a desnitrificação não apresentaram diferenças entre os ambientes avaliados e a abundância do gene *nifH*, mostrou ser favorecida em ambientes com maior disponibilidade de nutrientes e presença de plantas no solo.

Conclui-se que o uso do solo ao longo do tempo influenciou a abundância de micro-organismos, enquanto que a mudança de uso do solo alterou a composição microbiana em solos amazônicos. As principais diferenças observadas parecem estar relacionadas com alterações nos parâmetros químicos do solo como o valor de pH e a disponibilidade de nutrientes, que são consequentes da conversão de ambientes naturais para área de exploração agropecuária.

Os dados do presente estudo incentivam a continuidade dos trabalhos relacionando os ciclos biogeoquímicos com a mudança de uso do solo na região Amazônica, elucidando o impacto das alterações antropogênicas nesses solos. Para o entendimento dos processos e da dinâmica das comunidades envolvidas nos mesmos, poderão ser desenvolvidos modelos para experimentos em microcosmos, afim de simular um ambiente controlado com foco específico no ciclo do N, como a nitrificação, e, adicionalmente, utilização de abordagens de alta resolução através de plataformas de sequenciamento em larga escala como a metagenômica, metatranscritoma e fracionamento isotópico para elucidar a função dessas comunidades de micro-organismos nos ambientes avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABER, J. D. et al. Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. **Bioscience**, Washington, DC, v. 39, n. 6, p. 378-386, 1989.
- ACINAS, S. G. et al. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.
- ALMEIDA, C. A. D. et al. High spatial resolution land use and land cover mapping of the Brazilian Legal Amazon in 2008 using Landsat-5/TM and MODIS data. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 46, n. 3, p. 291-302, 2016.
- ARIAS, M. E. et al. Soil health: A new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, n. 1, p. 13-21, 2005.
- ARIMA, E. Y. et al. Statistical confirmation of indirect land use change in the Brazilian Amazon. **Environmental Research Letters**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 024010, 2011.
- ATTARD, E. et al. Shifts between *Nitrospira* and *Nitrobacter* like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 315-326, 2010.
- BADALUCCO, L.; KUIKMAN, P. J. Mineralization and immobilization in the rhizosphere. In: PINTON, R. et al. (ed.) **The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 159-196.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BAKKER, M. G. et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 392, n. 1-2, p. 115-126, 2015.
- BAKKER, P. A.; VAN PEER, R. O. N.; SCHIPPERS, B. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. **Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology**, Amsterdam, v. 23, p. 217-230, 1991.
- BANGE, H.; WILLIAMS, J. New directions: Acetonitrile in atmospheric and biogeochemical cycles. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 34, n. 28, p. 4959-4960, 2000.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 1-13, Apr 2009.
- BHANDARI, V.; GUPTA, R. S. The Phylum Thermotogae. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). **The prokaryotes**. Heidelberg: Springer, 2014. p. 989-1015.

- BLACK, A. et al. Influence of copper on expression of nirS, norB and nosZ and the transcription and activity of NIR, NOR and N2OR in the denitrifying soil bacteria *Pseudomonas stutzeri*. **Microbial Biotechnology**, Hoboken, v. 9, n. 3, p. 381-388, 2016.
- BLAINEY, P. C. et al. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e16626, 2011.
- BRAKER, G.; TIEDJE, J. M. Nitric oxide reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 6, p. 3476-3483, 2003.
- BRANDANI, C. B.; SANTOS, D. G. Transformações do carbono no solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016. p. 81-98.
- BULGARELLI, D. et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, London, v. 488, n. 7409, p. 91-95, 2012.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, London, v. 11, n. 12, p. 2639, 2017.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science**, Washington, DC, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.
- CATÃO, E. et al. Short-term impact of soybean management on ammonia oxidizers in a Brazilian savanna under restoration as revealed by coupling different techniques. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 52, n. 3, p. 401-412, 2016.
- CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, Pavia, v. 164, n. 4, p. 391-399, 2009.
- CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 907-916, 2009.
- COSTA, R. et al. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 236-249, 2006.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, n. 3, p. 221-226, 2004.

DAI, Z. et al. Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. **Global Change Biology**, Oxford, 2018. DOI: 10.1111/gcb.14163.

DAVIDSON, E. A. et al. The Amazon basin in transition. **Nature**, London, v. 481, n. 7381, p. 321, 2012.

DE MENDIBURU, F. **Agricolae**: statistical procedures for agricultural research. R Package Version. Madison: Bell Laboratories, 2014.

DE VRIES, F. T.; SHADE, A. Controls on soil microbial community stability under climate change. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, art. 265, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00265.

DIAS, A. C. F. Transformações do nitrogênio no solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016. p. 99-110.

DIAS, L. C. et al. Patterns of land use, extensification, and intensification of Brazilian agriculture. **Global Change Biology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 2887-2903, 2016.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 71-92, 2004.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 28, p. 137-167, 2003.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 2, n. 8, p. 621, 2004.

DONG, K. et al. Generalized soil Thaumarchaeota community in weathering rock and Sapolite. **Microbial Ecology**, New York, v. 69, n. 2, p. 356-360, 2015.

DONG, L. F. et al. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 10, p. 3171-3179, 2009.

DONG, L. F. et al. Dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, not denitrification or anammox, dominates benthic nitrate reduction in tropical estuaries. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 56, n. 1, p. 279-291, 2011.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 32, n. 1, p. 227-243, 2012.

DURRER, A. et al. The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 110, p. 12-20, 2017.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, Washington, DC, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

FALKOWSKI, P. G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. **Nature**, London, v. 387, n. 6630, p. 272, 1997.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5879, p. 1034-1039, 2008.

FEARNSIDE, P. M. Global warming and tropical land-use change: greenhouse gas emissions from biomass burning, decomposition and soils in forest conversion, shifting cultivation and secondary vegetation. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 46, n. 1-2, p. 115-158, 2000.

FERNANDES, S. A. P. **Propriedades do solo na conversão de floresta em pastagem fertilizada e não fertilizada com fósforo na Amazônia (Rondônia)**. 1999. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 227-241, 2002.

FERRARA, F. I. D. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, The Hague, v. 353, n. 1-2, p. 409-417, Apr 2012.

FERREIRA, S. J. F. et al. Nutrientes na solução do solo em floresta de terra firme na Amazônia Central submetida à extração seletiva de madeira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 1, p. 59-68, 2006.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-time PCR. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, Hoboken, n. 1, p. 10.3.1-10.3.34, 2008. DOI: 10.1002/9780470089941.et1003s00.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, n. 1-2, p. 35-59, 2009.

FRANCIS, C. A. et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, n. 41, p. 14683-14688, 2005.

GILES, C. D. et al. Phosphorus acquisition by citrate- and phytase- exuding *Nicotiana tabacum* plant mixtures depends on soil phosphorus availability and root intermingling. **Physiologia plantarum**, Lund, 2018. DOI: 10.1111/ppl.12718.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, Washington, DC, v. 283, n. 5407, p. 1476-1481, 1999.

GUBRY-RANGIN, C. et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 52, p. 21206-21211, 2011.

GUO, J. et al. Distinct drivers of activity, abundance, diversity and composition of ammonia-oxidizers: evidence from a long-term field experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 115, p. 403-414, 2017.

GUO, L. B.; GIFFORD, R. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. **Global Change Biology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 345-360, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST** - Palaeontological statistics. València, ES: Universitat de València, 2001. Disponível em: www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf. Acesso em: 25 jul. 2009.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. **Techniques**: Conversations with the silent majority. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 271-273, 2003.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, The Hague, v. 312, n. 1-2, p. 7-14, 2008.

HATHAWAY, J. J. M. et al. Comparison of bacterial diversity in Azorean and Hawaiian lava cave microbial mats. **Geomicrobiology Journal**, New York, v. 31, n. 3, p. 205-220, 2014.

HATZENPICHLER, R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 21, p. 7501-7510, 2012.

HATZENPICHLER, R. et al. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105, n. 6, p. 2134-2139, 2008.

HECKENBERGER, M. J. et al. The legacy of cultural landscapes in the Brazilian Amazon: implications for biodiversity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 362, n. 1478, p. 197-208, 2007.

HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 327-335, 2004.

HENRY, S. et al. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 8, p. 5181-5189, 2006.

- HERMAN, D. J. et al. Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 236-247, 2012.
- HEYLEN, K. et al. The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 2012-2021, 2006.
- HU, H.-W. et al. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 64, p. 18-27, 2013.
- HU, J. et al. Population size and specific potential of P-mineralizing and-solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. **Pedobiologia**, Jena, v. 53, n. 1, p. 49-58, 2009.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. D. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE. **Dados climáticos**. São José dos Campos. 2018. Disponível em: <<http://www.inpe.br/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.
- ISHAQ, S. L. et al. Impact of cropping systems, soil inoculum, and plant species identity on soil bacterial community structure. **Microbial Ecology**, New York, v. 73, n. 2, p. 417-434, 2017.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- JACOBSON, M. et al. **Earth System Science: from biogeochemical cycles to global changes**. New York: Academic Press, 2000.
- JIANG, X. X.; JIAO, N. Z. Vertical distribution of bacterial communities in the Indian Ocean as revealed by analyses of 16S rRNA and nasA Genes. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 56, n. 3, p. 309-317, 2016.
- JOERGER, R. D.; WOLFINGER, E.; BISHOP, P. E. The gene encoding dinitrogenase reductase 2 is required for expression of the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 14, p. 4440-4446, 1991.
- JONES, K. M. et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 8, p. 619-633, 2007.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, Pavia, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

KIM, Jong-Shik et al. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 684-690, 2007.

KING, D.; NEDWELL, D. B. Changes in the nitrate-reducing community of an anaerobic saltmarsh sediment in response to seasonal selection by temperature. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, n. 11, p. 2935-2941, 1984.

KITTELMANN, S. et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. 1, 2013. doi: 10.1093/nar/gks808.

KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 485-529, 2001.

KUYPERS, M. M. et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, London, v. 422, n. 6932, p. 608, 2003.

KÖNNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, n. 7058, p. 543, 2005.

LAM, P. et al. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, n. 12, p. 4752-4757, 2009.

LEFF, J. W. et al. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 112, n. 35, p. 10967-10972, 2015.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. et al. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 542-552, 2014.

LIGI, T. et al. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS*, *nirK*, and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 72, p. 47-55, 2014.

LIKENS, G.; BORMANN, F. H.; JOHNSON, N. Interactions between major biogeochemical cycles in terrestrial ecosystems. In: LIKENS, G. (Ed.). **Some perspectives of the major biogeochemical cycles**. Chichester: John Wiley & Sons, 1981. chap. 6, p. 93-112. (SCOPE, 17).

LILBURN, T. C. et al. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science**, Washington, DC, v. 292, n. 5526, p. 2495-2498, 2001.

LISBOA, F. J. G. et al. The match between microbial community structure and soil properties is modulated by land use types and sample origin within an integrated agroecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 78, p. 97-108, 2014.

LIU, J. et al. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 70, p. 113-122, 2014.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, n. 1, p. 171-189, 2008.

LOPES, K. B. D. et al. Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 120, n. 3, p. 740-755, 2016.

LOPEZ, N. V.; BINI, D.; LOURENÇO, M. V. M. Transformações do enxofre no solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016. p. 167-177.

LUNDBERG, D. S. et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, London, v. 488, n. 7409, p. 86, 2012.

MCCLIMENT, E. A. et al. Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 114-125, 2006.

MCGRATH, D. A. et al. Effects of land-use change on soil nutrient dynamics in Amazonia. **Ecosystems**, New York, v. 4, n. 7, p. 625-645, 2001.

MEEBOON, N. et al. Changes in bacterial diversity associated with bioremediation of used lubricating oil in tropical soils. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 199, n. 6, p. 839-851, 2017.

MENDES, L. W. et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 8, p. 1577, 2014.

MENDES, L. W. et al. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial Ecology**, New York, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015.

MIRZA, B. S. et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon rainforest. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 80, n. 1, p. 281-288, 2014.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 431-432.

MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 177-183, 1995.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAM, J.-H.; YEOM, I. T.; JAHNG, D. Structural and kinetic characteristics of 1, 4-Dioxane-degrading bacterial consortia containing the Phylum TM7. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 11, p. 1951-1964, 2016.

NASA. **Earth fact sheet**. Greenbelt, MD, 2016. Disponível em: <<https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/factsheet/earthfact.html>>. Acesso em: 26 dez. 2016.

NAVARRETE, A. A. et al. Differential response of acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the Western Brazilian Amazon. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01443.

NEVES, E. J.; MARTINS, E. G.; REISSMANN, C. B. Deposição de serapilheira e de nutrientes de duas espécies da Amazônia. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 47-60, 2001.

NORTON, J. M. Diversity and environmental distribution of ammonia-oxidizing bacteria. In: WARD, B. B.; ARP, D. J.; KLOTZ, M. G. (Ed.). **Nitrification**. Washington, DC: ASM, 2011. p. 39-55. DOI: 10.1128/9781555817145.ch3.

ORR, C. H. et al. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, n. 1, p. 208-214, 2015.

OUYANG, Y. et al. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 96, p. 4-15, 2016.

PAJARES, S.; BOHANNAN, B. J.; SOUZA, V. Editorial: The role of microbial communities in tropical ecosystems. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, art. 1805, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01805.

PAUL, E. A. **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. New York: Academic Press, 2014.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 2988-2999, 2014.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 89-98, 2002.

PESTER, M. et al. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 3055-3071, 2014.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 300-306, 2011.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 11, n. 11, p. 789, 2013.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 95-103, 2001.

PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, n. 11, p. 523-531, 2012.

PUCKETT, L. J.; TESORIERO, A. J.; DUBROVSKY, N. M. **Nitrogen contamination of surficial aquifers: a growing legacy**. Washington, DC: ACS Publications, 2010. p. 839-844.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Auckland: R Project, 2013.

REAVY, B. et al. Distinct circular single-stranded DNA viruses exist in different soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 81, n. 12, p. 3934-3945, 2015. ISSN 0099-2240.

RICHARDSON, D. J. et al. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, n. 2, p. 165-178, 2001.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.

ROMAGNOLI, E. R.; ANDREOTE, F. D. Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016. p. 47-60.

ROTHHAUWE, J.-H.; WITZEL, K.-P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 10, p. 1340, 2010.

ROUX-MICHOLLET, D. et al. Effects of steam disinfestation on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1836-1845, 2008.

SCHEFFLER, R. et al. Soil hydraulic response to land-use change associated with the recent soybean expansion at the Amazon agricultural frontier. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 281-289, 2011.

SCHIPPERS, B. et al. Biological control of pathogens with rhizobacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 318, p. 283-293, 1988.

SCHUTTE, U. M. E. et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 3, p. 365-380, 2008.

SEARS, K. et al. Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31, n. 8, p. 369-378, 2004.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, London, v. 2, p. 587, 2013. DOI: 10.1186/2193-1801-2-587.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 209, 2014. DOI: 10.3389/fpls.2014.00209.

SILES, J. A. et al. Altitudinal, seasonal and interannual shifts in microbial communities and chemical composition of soil organic matter in Alpine forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 112, p. 1-13, 2017.

SILVER, W. L.; HERMAN, D. J.; FIRESTONE, M. K. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. **Ecology**, Hoboken, v. 82, n. 9, p. 2410-2416, 2001.

SINGH, J. S. et al. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 529, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00529.

SMALLA, K. et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, 2001.

SMIL, V. Detonator of the population explosion. **Nature**, London, v. 400, n. 6743, p. 415-415, 1999.

SOARES-FILHO, B. S. et al. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, London, v. 440, n. 7083, p. 520-523, 2006.

SONG, Y. et al. Biochar addition affected the dynamics of ammonia oxidizers and nitrification in microcosms of a coastal alkaline soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 321-332, 2014.

SONTER, L. et al. A land system science meta-analysis suggests we underestimate intensive land uses in land use change dynamics. **Journal of Land Use Science**, London, v. 10, n. 2, p. 191-204, 2015.

SONTER, L. J. et al. Mining drives extensive deforestation in the Brazilian Amazon. **Nature Communications**, London, v. 8, n. 1, p. 1013, 2017.

SOUSA, R. S. **Caracterização sazonal de comunidades de Bacteria e Archaea em sedimentos de lagoas naturais rasas no Cerrado**. 2016. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.

STAHL, D. A.; AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. R94-R98, 2016.

STERNGREN, A. E.; HALLIN, S.; BENGTSON, P. Archaeal ammonia oxidizers dominate in numbers, but bacteria drive gross nitrification in N-amended grassland soil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1350, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01350.

TATE, K. R. **Microbial biomass: A paradigm shift in terrestrial biogeochemistry**. New Jersey: World Scientific, 2017. ISBN 1786341328.

TER BRAAK, C. J.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4)**. Itaka: Micromputer Power: Centre for Biometry, 1998.

TOURNA, M. et al. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 20, p. 8420-8425, 2011.

TRIPATHI, B. M. et al. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 303-311, 2013.

VAN LOON, L.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 2, p. 390-397, 2001.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

WALKER, C. et al. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 19, p. 8818-8823, 2010.

WALLENSTEIN, M. D.; VILGALYS, R. J. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, n. 6, p. 665-672, 2005.

WAUGH, S. I. et al. The genes encoding the delta subunits of dinitrogenases 2 and 3 are required for mo-independent diazotrophic growth by Azotobacter vinelandii. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 177, n. 6, p. 1505-1510, 1995.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, n. 1, p. 379-407, 1988.

WITTY, J. et al. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. In: MIFLIN, B. J. (Ed.). **Oxford surveys of plant molecular and cell biology**. Oxford: Oxford University Press, 1986. v. 3, p. 275-314.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WU, X. et al. Irrigation management and phosphorus addition alter the abundance of carbon dioxide-fixing autotrophs in phosphorus-limited paddy soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 93, n. 12, p. fix154, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix154.

XIE, Z. et al. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 77, p. 89-99, 2014.

XIN, X. et al. Manganese oxide affects nitrification and ammonia oxidizers in subtropical and temperate acid forest soils. **Catena**, Cremlingen, v. 137, p. 24-30, 2016.

YANG, L. et al. Duration of continuous cropping with straw return affects the composition and structure of soil bacterial communities in cotton fields. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 64, n. 3, p. 167-181, 2017.

YOUNG, J.; STACEY, G. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. **Biological Nitrogen Fixation**, Hoboken, v. 23, p. 43-86, 1992.

YOUSUF, B. et al. Differential distribution and abundance of diazotrophic bacterial communities across different soil niches using a gene-targeted clone library approach. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 360, n. 2, p. 117-125, 2014.

YOSHIURA C. A. **Influência dos sistemas agrícolas e reflorestamento na estrutura das comunidades microbianas associadas ao ciclo do carbono do Alto Xingu**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ZEHR, J. P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

ZELLER, B. et al. Tree girdling increases soil N mineralisation in two spruce stands. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 1155-1166, 2008.

ZHALNINA, K. et al. Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 210, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00210.

ZHANG, L.-M. et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 5, p. 1032, 2012.

ZHONG, Y. et al. Net ammonium and nitrate fluxes in wheat roots under different environmental conditions as assessed by scanning ion-selective electrode technique. **Scientific Reports**, London, v. 4, art. 7223, 2014. DOI: 10.1038/srep07223.

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 61, n. 4, p. 533-616, 1997.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Figura S1 – Curva de rarefação das amostras sequenciadas de *Bacteria*

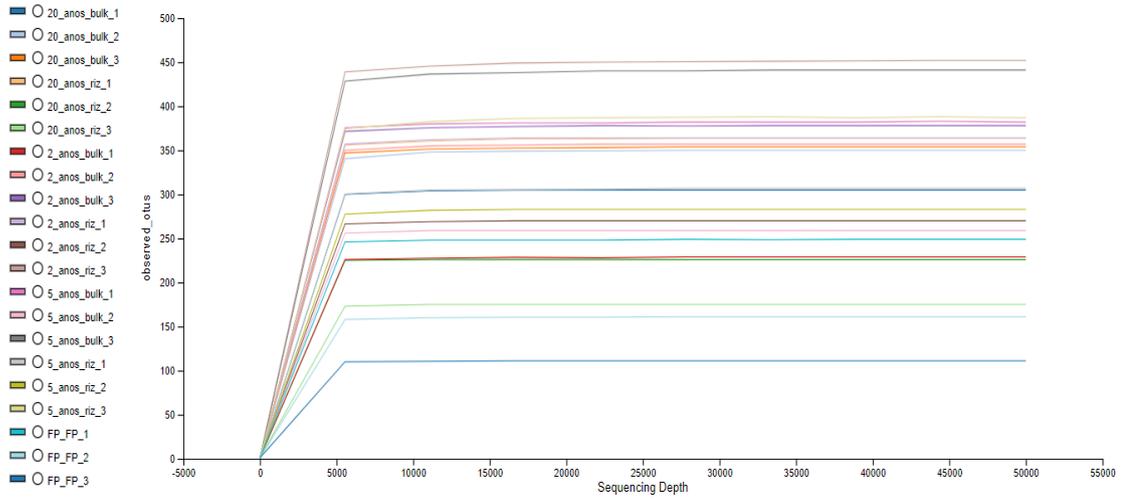


Figura S2 – Curva de rarefação das amostras sequenciadas de *Archaea*

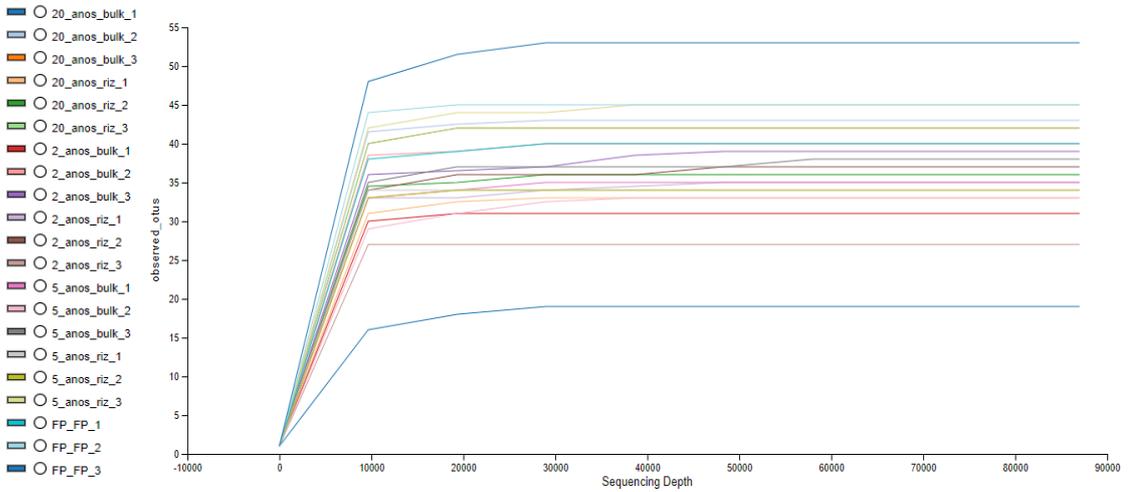


Tabela S1 – Informações de sequenciamento após o processamento de qualidade, utilizando a sequência *forward* de *Bacteria* e *Archaea*

| Amostras | Número de sequências | |
|--------------------------------|----------------------|----------------|
| | <i>Bacteria</i> | <i>Archaea</i> |
| 2_anos_riz | 169129 | 178983 |
| 2_anos_riz | 115769 | 129457 |
| 2_anos_riz | 200660 | 133092 |
| 5_anos_riz | 128121 | 122674 |
| 5_anos_riz | 123673 | 104346 |
| 5_anos_riz | 161975 | 154170 |
| 20_anos_riz | 165372 | 131092 |
| 20_anos_riz | 99458 | 126615 |
| 20_anos_riz | 67431 | 158578 |
| 2_anos_bulk | 104173 | 145099 |
| 2_anos_bulk | 185568 | 149956 |
| 2_anos_bulk | 199673 | 195714 |
| 5_anos_bulk | 190620 | 221331 |
| 5_anos_bulk | 120645 | 134352 |
| 5_anos_bulk | 221882 | 230416 |
| 20_anos_bulk | 124484 | 139549 |
| 20_anos_bulk | 170090 | 148520 |
| 20_anos_bulk | 175396 | 194438 |
| FP | 185431 | 161382 |
| FP | 131167 | 153017 |
| FP | 71043 | 180025 |
| -----Todas as sequências ----- | | |
| Média | 148179,05 | 156800,29 |
| Mínimo | 67431 | 104346 |
| Máximo | 221882 | 230416 |
| Total | 3111760 | 3292806 |