



PRISCILA PEREIRA DINIZ

**A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA
AVALIAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA DIVERSIDADE
MICROBIANA DOS SOLOS TROPICAIS**

**LAVRAS - MG
2021**

PRISCILA PEREIRA DINIZ

**A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA AVALIAÇÃO E
PRESERVAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DOS SOLOS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
Coorientador

**LAVRAS-MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Diniz, Priscila Pereira.

A importância das camadas orgânicas para avaliação e
preservação da diversidade microbiana dos solos tropicais /
Priscila Pereira Diniz. - 2021.

146 p. : il.

Orientador(a): Ederson da Conceição Jesus.

Coorientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Ecologia microbiana. 2. Camadas orgânicas do solo. 3.
Amazônia. I. Jesus, Ederson da Conceição. II. Dias, Eustáquio
Souza. III. Título.

PRISCILA PEREIRA DINIZ

**A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA AVALIAÇÃO E
PRESERVAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DOS SOLOS TROPICAIS**

**THE IMPORTANCE OF ORGANIC LAYERS FOR THE ASSESSMENT AND
PRESERVATION OF MICROBIAL DIVERSITY IN TROPICAL SOILS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de agosto de 2021.

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA
Dra. Siu Mui Tsai	CENA/USP
Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Dr. José Oswaldo de Oliveira	UFLA

Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado e iluminado todos os meus passos até aqui!

A meu orientador Ederson pela amizade, ensinamentos, compreensão de sempre e por tornar esse processo muito mais leve. Foi um grande prazer ser sua aluna! Obrigada por tudo!

À professora Tsai pelo espaço e suporte para as análises no CENA. Muito obrigada por tudo! Sua ajuda foi essencial!

À querida Beatriz por todo o suporte nas análises de qPCR e, sobretudo, pela amizade!

Ao professor Eustáquio por ser sempre tão solícito e ter me ajudado quando necessário! Muito obrigada!

A todos membros da banca por aceitarem o convite e participar desse processo. Tenho certeza que contribuirão de forma valiosa!

Um agradecimento especial para toda a equipe presente na coleta: Ederson, Aline, Maurício, João e, principalmente, Osar e seus pais, Sr. João e Sra. Mirtes, que nos receberam e nos acolheram com tanto carinho em sua casa. Muito obrigada! Foram dias muito especiais que a “Patrícia” (como dona Mirtes me chamava) sempre lembrará com muito carinho.

A meu noivo (quase marido) Rodrigo. Sem você eu não teria chegado até aqui! Obrigada por tudo, pelo companheirismo e por entender a ausência em alguns momentos.

A meus pais, Shirlei e Dirceu, e ao meus pais do coração, Júlia e José, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e a superar todos os obstáculos da vida!

À minha querida irmã Louise, a meu cunhado Maurício, minha sobrinha Isabelle, minha vó Emília e demais familiares pela amizade, carinho e apoio de sempre.

Às amigas da UFLA, Embrapa e da vida: Carol, Camila, Aline, Lili, Lundoi, Dani, Gi! Obrigada pelo companheirismo e carinho de sempre!

À querida amiga Kerly pelo carinho, amizade e por sempre me acolher quando preciso! Obrigada por tudo, amiga!

Aos amigos Fernando e Thiago pela amizade e por toda ajuda nas análises! Obrigada!

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e a todos os professores pela oportunidade do doutorado e por todo aprendizado!

À Embrapa Agrobiologia que desde a iniciação científica me deu suporte e me ensinou tanto!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma tornaram esse projeto concreto!

RESUMO

A microbiota das camadas orgânicas (folhas em diferentes estágios de decomposição e húmus) dos solos florestais da Amazônia representa uma comunidade ainda pouco conhecida. Sabe-se que a mudança do uso do solo altera a diversidade e composição dos microrganismos desse sistema, mas até o momento, pouco se conhece acerca dos impactos sobre os microrganismos associados às camadas orgânicas. Considerando que essas camadas abrigam elevada diversidade de microrganismos na floresta e sua perda com a conversão floresta-pastagem resulta, conseqüentemente, em perda de diversidade, este estudo investigou a riqueza e diversidade de bactérias, fungos e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) contidas nas camadas orgânicas e também no solo mineral de uma floresta e uma pastagem na Amazônia, por meio do sequenciamento dos amplicons 16S rRNA, ITS e 18S rRNA, respectivamente. Para avaliar a funcionalidade das comunidades presentes, quantificou-se genes funcionais envolvidos no ciclo do N através de qPCR (fixadores de N₂, AOB, AOA e desnitrificadores). Foram coletadas camadas em diferentes estágios de decomposição da matéria orgânica de uma floresta (camada composta por folhas inteiras – L, fragmentadas – F, húmus - H e o solo mineral) e de uma pastagem (camadas L, F, solo mineral e rizosférico) no Pará, Brasil. Avaliando a diversidade das camadas orgânicas e do solo mineral em conjunto, a diversidade alfa de bactérias e fungos foi maior na pastagem e de FMA não foi alterada. Para diversidade beta, as camadas orgânicas foram essenciais para diferenciar os sistemas de uso do solo. A composição das comunidades de bactérias, fungos totais e FMA diferiram entre as camadas orgânicas e o solo mineral, mas também entre os dois sistemas, floresta e pastagem. Os grupos funcionais do ciclo do N (exceto AOB) foram mais abundantes na camada F da pastagem. Esses grupos foram abundantes no horizonte H da floresta e, assim como na pastagem, AOB também foi abundante nas camadas de folhas L e F. Em conjunto, esses resultados destacam as camadas orgânicas como um compartimento de alta diversidade microbiana e de potencial relevância para o ciclo do N não só em ambiente florestal, mas também em pastagem.

Palavras-chave: Amazônia, 16S rRNA, ITS, 18S rRNA, Ciclo do N

ABSTRACT

The microbiota of organic layers (leaves in different stages of decomposition and humus) of Amazonian forest soils represent a community that is still little known. It is known that the change in land use alters the diversity and composition of microorganisms in this system, but so far, little is known about the impacts on microorganisms associated with organic layers. These layers harbor the diversity of microorganisms in the forest and their loss with the forest-pasture conversion results, consequently, in a loss of diversity. This study investigated the richness and diversity of bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) contained in organic soil and also in mineral from a forest and pasture in the Amazon, by sequencing 16S rRNA, ITS and 18S rRNA amplicons, respectively. To assess the functionality of the communities present, genes affected in the N cycle were quantified by qPCR (N_2 fixers, AOB, AOA and denitrifiers). Layers at different stages of organic matter decomposition were collected from a forest (layer composed of whole leaves - L, fragmented - F, humus - H and mineral soil) and from a pasture (layers L, F, mineral and rhizospheric soil) in the state of Pará, Brazil. Assessing the diversity of organic layers and mineral soil together, the diversity of bacteria and fungi was greater in the pasture and the AMF were not altered. For beta diversity, organic layers were essential to differentiate land use systems. Bacterial, total fungal and AMF communities differed between organic layers and mineral soil, but also between the two systems, forest and pasture. The adaptive groups of the N cycle (except AOB) were more abundant in the F layer of the pasture. These groups were abundant in the H horizon of the forest and, like in the pasture, AOB was also abundant in the L and F leaf layers. Together, these results highlight how the organic layers are a site of high microbial diversity and separate potential for the cycle of N, not only in a forest environment, but also in a pasture.

Keywords: Amazon, 16S rRNA, ITS, 18S rRNA, N Cycle

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Mudança do uso do solo e diversidade microbiana na Amazônia	13
2.2 Camadas orgânicas do solo e microrganismos	18
2.3 Fungos micorrízicos arbusculares	21
2.4 Ciclo do nitrogênio	22
2.5 Biologia molecular no estudo de ecologia microbiana.....	25
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2 – ONDE ESTÁ A DIVERSIDADE? A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA AVALIAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO NA FLORESTA TROPICAL	41
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Área de estudo e amostragem	45
2.2 Análise química das camadas orgânicas e solo mineral	47
2.3 Extração de DNA	48
2.4 Sequenciamento e análises de bioinformática	49
2.5 PCR em tempo real de genes do ciclo do nitrogênio.....	49
2.6 Análise de dados e estatística	50
3 RESULTADOS.....	51
3.1 Propriedades químicas dos solos	51
3.2 Estrutura da comunidade microbiana	52

3.3	Composição da comunidade microbiana	53
3.4	Diversidade da comunidade microbiana.....	54
3.5	Abundância dos genes funcionais do ciclo do nitrogênio	57
4	DISCUSSÃO.....	62
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES.....	75
	CAPÍTULO 3 – CONTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS ORGÂNICAS NA DIVERSIDADE DE FUNGOS DOS SOLOS TROPICAIS NA AMAZÔNIA	82
1	INTRODUÇÃO	84
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.1	Descrição da área e amostragem	86
2.2	Análise química do solo	87
2.3	Extração de DNA e sequenciamento de alto rendimento	88
2.4	Processamento de dados do sequenciamento.....	88
2.5	Análises de dados e estatística.....	88
2.6	Análise de redes de correlação	89
2.7	Predição funcional com FunGuild.....	90
3	RESULTADOS.....	90
3.1	Propriedades químicas do solo.....	90
3.2	Composição taxonômica e estrutura das comunidades	91
3.3	Análise de partição de diversidade	94
3.4	Índices de diversidade alfa individuais	95
3.5	Análise de redes de correlação	95
3.6	Grupos funcionais	98
4	DISCUSSÃO.....	100
5	CONCLUSÃO	103

REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE.....	108
CAPÍTULO 4 – A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA A DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA AMAZÔNIA ORIENTAL.....	115
1 INTRODUÇÃO	117
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	119
2.1 Local de estudo e amostragem	119
2.2 Extração de DNA e sequenciamento do gene 18S rRNA.....	120
2.3 Análise de dados e estatística	120
3 RESULTADOS.....	121
3.1 Propriedades químicas do solo.....	121
3.2 Composição e estrutura da comunidade de FMA.....	122
3.3 Diversidade de FMA	126
4 DISCUSSÃO.....	130
5 CONCLUSÃO	134
REFERÊNCIAS	135
CONCLUSÃO GERAL.....	143
REFERÊNCIAS	145

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais, como a Amazônica, são importantes reservatórios de biodiversidade acima e abaixo do solo, participando de processos ecossistêmicos essenciais como regulação do clima, reservatórios de C orgânico e metano, entre outros. Na Amazônia, em resposta a solos de baixa fertilidade, a floresta desenvolveu estratégias para melhorar o aproveitamento de nutrientes. A presença de raízes em meio à serapilheira e ao húmus (quando presente) auxiliam a floresta na absorção de nutrientes recém mineralizados, antes mesmo que sejam lixiviados ou complexados no solo mineral. Além disso, associações com fungos micorrízicos, bactérias fixadoras de nitrogênio e outros microrganismos benéficos do solo também suportam a produtividade da floresta. Diante da relação da floresta com a serapilheira e os microrganismos associados, presume-se que nesse compartimento do solo florestal ocorra uma dinâmica e complexa atividade microbiana, devido à sua participação na decomposição da serapilheira, à interação entre os próprios microrganismos e também à elevada concentração de raízes, já que a rizosfera é um importante *hotspot* microbiano.

A abertura de novas áreas de pastagem, frente a expansão de atividades agropecuárias em direção à bacia amazônica, representa uma das maiores causas de desmatamento das florestas da região (TYUKAVINA et al., 2017). A mudança do uso do solo afeta diretamente a fauna e a flora, mas também as comunidades de microrganismos do solo. Estudos mostram que as áreas de pastagem abrigam composição de microrganismos diferente em relação à floresta e que a conversão geralmente aumenta a diversidade alfa de bactérias e fungos, apesar de ainda existirem poucas informações para fungos (JESUS et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2018). Em consequência disso, funções microbianas importantes também são alteradas como: modificações nos processos do ciclo do C e do N, aumentando a emissão de gases de efeito estufa como CO₂ e N₂O, aumento da resistência a antibióticos, maior abundância de patógenos potenciais nas áreas convertidas, entre outros (PAULA et al., 2014; CERQUEIRA et al., 2018; LEMOS et al., 2021). Além disso, a diversidade de plantas está diretamente ligada à quantidade e qualidade da serapilheira, que por sua vez afeta as comunidades microbianas e, portanto, presume-se que a redução da diversidade vegetal na pastagem afete também a diversidade microbiana das camadas orgânicas. Entretanto, até o momento, estudos que consideram

esse compartimento nos estudos de diversidade microbiana são escassos (RITTER et al. 2018; ROCHA et al 2021) e, portanto, pouco se sabe como as comunidades das camadas orgânicas contribuem para a diversidade de microrganismos do solo na amazônia e, sobretudo, como são afetadas com a mudança de uso do solo.

Diante desta lacuna, foi hipotetizado que as camadas orgânicas abrigam uma elevada diversidade de microrganismos em relação ao solo mineral adjacente e, portanto, ao incluí-las nas análises, observa-se uma redução de diversidade na pastagem. Em consequência dessa maior diversidade nas camadas orgânicas, também foi hipotetizado que esse compartimento do solo abriga maior abundância de genes funcionais relacionados ao ciclo do N em relação ao solo mineral adjacente, independente do uso da terra. Assim, este estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da conversão floresta-pastagem sobre a diversidade de microrganismos ao incluir as camadas orgânicas nas análises. Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a composição da comunidade de bactérias (Capítulo 2), fungos (Capítulo 3) e fungos micorrízicos arbusculares (Capítulo 4) nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e pastagem, assim como a estrutura de suas comunidades e diversidade por meio do sequenciamento dos amplicons 16S rRNA (bactérias), ITS (fungos) e 18S rRNA (FMA);
- b) Calcular a diversidade de bactérias (Capítulo 2), fungos (Capítulo 3) e FMA (Capítulo 4) do solo como um todo, considerando as camadas orgânicas e o solo mineral, e comparar os valores entre floresta e pastagem;
- c) Quantificar a abundância do gene taxonômico 16S rRNA de Bacteria e Archaea e genes chave da fixação de nitrogênio (*nifH*), nitrificação (*amoA* de Bacteria e Archaea) e desnitrificação (*nirS* e *nosZ*) nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e da pastagem (Capítulo 2);
- d) Realizar a predição dos modos tróficos dos fungos das camadas orgânicas e do solo mineral da floresta e da pastagem (Capítulo 3).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mudança do uso do solo e diversidade microbiana na Amazônia

A Floresta Amazônica é um ecossistema de alta importância ambiental, pois abriga elevada biodiversidade e desempenha serviços ambientais essenciais e insubstituíveis, como manutenção de ciclos biogeoquímicos e regulação do clima global (Davison et al., 2012). Entretanto, nas últimas décadas, a Bacia Amazônica tem sido submetida à elevadas taxas de desmatamento, sendo a abertura de pastagens um dos principais contribuintes (TYUKAVINA et al., 2017; SOUSA-JUNIOR et al., 2020). A mudança do uso da terra, impulsionada pelas atividades antrópicas, é considerada responsável por grande perda de biodiversidade nos trópicos (SALA et al., 2000). O desmatamento representa perda e alteração do habitat florestal, fragmentando a floresta (VILLARD; METZGER, 2014) e gerando impactos sobre os serviços ambientais, a flora, a fauna e também sobre a microbiota do solo e todos os processos pelos quais são responsáveis (FRANCO et al., 2019; MELO et al., 2021).

Um grande esforço tem sido realizado para entender os efeitos da mudança do uso do solo na composição taxonômica e na funcionalidade das comunidades microbianas. Vários estudos apontam para uma mudança a nível de estrutura, diversidade e funcionalidade, impulsionadas por mudanças bióticas e abióticas no solo (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; MUELLER et al., 2014, 2016; PAULA et al., 2014; MENDES et al., 2015a; MENDES et al., 2015b; CARVALHO et al., 2016; MERLOTI et al., 2019; PEDRINHO et al., 2019;)

Na conversão da floresta é utilizado o sistema de “corte e queima” que consiste na retirada de árvores de importância econômica e, posteriormente, no corte e queima do restante da vegetação, resultando na deposição de cinzas da vegetação queimada sobre o solo e aumento da taxa de decomposição da matéria orgânica (JUO & MANU, 1996). Esse sistema afeta principalmente as camadas superficiais do solo (DA SILVA NETO et al., 2019) e a ação do fogo reduz significativamente a biomassa microbiana (WANG et al., 2012) e sua estrutura filogenética (FERRENBURG et al., 2013), o que, conseqüentemente, altera a composição e funcionalidade das comunidades microbianas (XIANG et al., 2015a).

Os efeitos da conversão sobre as comunidades de bactérias foram os mais estudados na Amazônia. Foi visto que a diversidade alfa bacteriana (mas também de

arqueias) aumenta após a conversão da floresta e que ocorrem variações nas abundâncias relativas dos principais filos do solo como Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes e Firmicutes (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2011; NAVARRETE et al., 2013; RAJAN et al., 2015; PEDRINHO et al., 2019). Essas alterações são consequências das mudanças nas propriedades químicas do solo, devido à alteração da cobertura vegetal e ao manejo das áreas pós-desmatamento. A maioria dos estudos relataram o efeito do pH do solo sobre as variações de abundâncias dos grupos taxonômicos (por exemplo, MENDES et al., 2015b). No ambiente do solo, o pH é uma variável principal e está relacionada a alterações em outros fatores, como concentração de Al e disponibilidade de nutrientes (NAVARRETE et al., 2013), que também podem afetar as comunidades de microrganismos do solo (LAMMEL et al., 2015). Entretanto, ao investigar as respostas da comunidade de Acidobacteria ao manejo agrícola dos solos em locais de produção de soja, Navarrete et al. (2013) observaram que as respostas dependiam dos subgrupos observados, ou seja, cada subgrupo de Acidobacteria respondia a diferentes fatores do solo que não eram necessariamente relacionados à acidez do solo. Outros estudos observando o filo Acidobacteria (NAVARRETE et al., 2015c) e Verrucomicrobia (NAVARRETE et al., 2015b; RAJAN et al., 2015) também observaram diferentes fatores influenciando na abundância dos filos (por exemplo, a fertilidade do solo) e relataram que os estudos voltados para grupos específicos podem possibilitar sua utilização como bioindicadores do manejo dos solos da Bacia Amazônica.

Os fungos foram estudados em menor proporção em relação às bactérias, portanto ainda não estão claros os efeitos da mudança do uso do solo, mas já foi observada diminuição da riqueza em pastagens (MUELLER et al., 2014; 2016) ou nenhuma alteração (CERQUEIRA et al., 2018) e um aumento de diversidade alfa (CERQUEIRA et al., 2018) ou nenhuma alteração (FRACETTO et al., 2013). Apesar dessas divergências, todos os estudos observaram mudanças na composição da comunidade fúngica do solo. Os filos Ascomycota e Basidiomycota geralmente predominam nos solos (MCGUIRE et al., 2012; PEAY; BARALOTO; FINE, 2013). Ascomycota foi dominante na maior parte dos estudos tanto em florestas primárias e secundárias quanto em pastagens (MUELLER et al., 2014; 2016; CERQUEIRA et al., 2018), entretanto, Basidiomycota apresentou abundâncias relativas variadas entre os estudos. No ecossistema florestal, a composição e diversidade de fungos foram relacionadas às variáveis edáficas, como pH e nutrientes do solo, e diversidade de plantas (STRICKLAND; ROUSK, 2010; PEAY;

BARALOTO; FINE, 2013; LUCHETA et al., 2016; VASCOS-PALÁCIOS et al., 2020). De fato, alguns estudos de uso da terra encontraram forte influência da diversidade de plantas na comunidade de fungos (FRACETTO et al 2013; MUELLER 2014) assim como efeitos dos teores de Zn, Fe e Cu (CERQUEIRA et al., 2018). A distância até a borda da floresta primária também correlacionou-se com a composição de fungos da pastagem, na Amazônia (MUELLER et al., 2016), indicando a importância da floresta como uma fonte de propágulos fúngicos.

Estudos de grupos de fungos mais específicos, como os FMA também são escassos na Amazônia e ainda não foi realizada nenhuma investigação a nível molecular, apenas através da caracterização morfológica de esporos. Geralmente, áreas perturbadas apresentaram maior abundância de esporos em relação à floresta intocada (LEAL et al., 2009; STÜRMER; SIQUEIRA, 2011; LEAL et al., 2013). Stürmer & Siqueira (2011) não observaram diferença significativa na densidade de esporos entre floresta intocada e pastagem, entretanto, o valor da pastagem foi 5 vezes superior. Além disso, esses autores encontraram um aumento da riqueza e diversidade de espécies em áreas de lavouras, sistema agroflorestal e floresta secundária jovem. Leal et al. (2013) observaram maior abundância de esporos de FMA na pastagem, entretanto, não encontraram diferenças entre floresta e pastagem em relação à riqueza média de esporos, diversidade de Shannon e equitabilidade de Pielou. Os resultados desses estudos indicam uma elevada resiliência dos FMA e que a simbiose micorrízica pode ser uma estratégia pela qual fungos e plantas superam estresses bióticos e abióticos que ocorrem com a mudança do uso do solo (PEREIRA et al., 2014).

Em relação à diversidade beta, que corresponde à diversidade entre locais de uma área geográfica de interesse (WITTAKER, 1972), um estudo bastante importante na Amazônia observou que a conversão floresta-pastagem diminuiu a diversidade beta de bactérias, significando que as comunidades eram mais semelhantes em composição através do solo alterado, gerando uma homogeneização biótica (RODRIGUES et al., 2013). Isso reflete em uma homogeneização de características, que reduz a resiliência do ecossistema à perturbação (OLDEN et al., 2004; RODRIGUES et al., 2013). Entretanto, Carvalho et al. (2016) encontraram aumento da diversidade beta de bactérias em áreas convertidas para pastagem e agricultura mecanizada, argumentando que esses resultados provavelmente estariam ligados à heterogeneidade do pH do solo.

As mudanças na composição microbiana estão frequentemente ligadas a alterações nas taxas de processos ecossistêmicos (ALLISON & MARTINY, 2008). Paula

et al. (2014) avaliaram os impactos da conversão em grupos funcionais de genes envolvidos em diferentes processos microbianos, incluindo ciclos biogeoquímicos, degradação de compostos orgânicos, resistências a antibióticos e estresse. Os autores observaram maior diversidade de genes funcionais na floresta primária em relação à pastagem, o que foi oposto ao encontrado para diversidade taxonômica estimada no mesmo local usando o gene 16S rRNA (CENCIANI et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013). Além disso, também observaram que na floresta primária havia maior número de sequências genéticas diferentes referentes as mesmas funções, sugerindo maior redundância funcional nesse local. Já Mendes et al. (2015a), em uma abordagem metagenômica, encontraram maior diversidade funcional e riqueza de gêneros bacterianos desempenhando funções específicas nos solos agrícolas e pastagens, o que está de acordo com os achados de Pedrinho et al. (2019) para pastagens. Entretanto, na floresta, a abundância de genes relacionados a funções importantes era de 2 a 4 vezes superior, sugerindo que o equilíbrio funcional na floresta é mantido com base na abundância e não na diversidade (Mendes et al., 2015a). Em um estudo recente, Lemos et al. (2021) verificaram um aumento de genes de resistência a antibióticos em pastagens e campos agrícolas em comparação com florestas nativas e secundárias, na Amazônia, os quais são passíveis de entrar na cadeia alimentar por meio do consumo de carne, vegetais e outros alimentos (CHENG et al., 2020). Especificamente na comunidade de fungos, houve um aumento de fungos generalistas em decorrência da conversão da floresta-pastagem (MUELLER et al., 2016), assim como o aumento de fitopatógenos potenciais, como *Fusarium*, e redução de gêneros relacionados ao biocontrole, como *Trichoderma* (CERQUEIRA et al. 2018). Portanto, todos esses resultados sugerem que as comunidades microbianas nos solos das áreas convertidas e da floresta abrigam diferentes conteúdos genéticos funcionais, indicando que o uso da terra pode afetar não apenas a taxonomia (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013), mas também a composição funcional em solos da Amazônia.

Com a regeneração das florestas secundárias, após o abandono das pastagens, algumas características funcionais potenciais podem ser recuperadas e, apesar de ainda distintas, a composição das comunidades bacterianas da floresta secundária torna-se mais próxima à da floresta primária (PEDRINHO et al., 2019). Entretanto, na Amazônia brasileira, as florestas secundárias estão sendo perdidas em um ritmo acelerado nos

últimos anos (WANG et al., 2020) e a intensificação do uso da terra reflete-se em perda de resiliência dessas florestas (JAKOVAC et al., 2015).

Uma outra linha de estudos tem surgido a fim de entender quais processos governam a montagem e a diversificação das comunidades microbianas na Amazônia (MENDES et al., 2015b; GOSS-SOUZA et al., 2017; 2020). Para responder a esses questionamentos, é necessário entender as teorias ecológicas. Segundo um levantamento de Goss-Souza et al., 2017, existem dois modelos contrastantes de montagem de espécies em comunidades: modelo determinístico e modelo estocástico. O primeiro é baseado em nicho, que considera fatores abióticos e bióticos como fatores primários nas diferenças do taxa (CARROL et al., 2011), e o segundo é baseado em um modelo neutro, com foco em eventos probabilísticos e aleatórios para explicar a estruturação de comunidades, que se baseia na seleção homogeneizadora (HUBBELL et al., 2001; ALONSO & MCKANE, 2004; DINI-ANDREOTE et al., 2015). Mendes et al., (2014) testaram a validade das teorias neutra e de nicho para explicar os processos de montagem da comunidade da rizosfera de soja em plantio sob solos amazônicos convertidos e constataram que a comunidade presente é baseada em processos de nicho, como resultado do poder de seleção da planta e de outros fatores ambientais. Ou seja, a planta é capaz de selecionar microrganismos benéficos a ela e as funções destes estavam relacionadas a promoção de crescimento e nutrição. Goss-Souza et al. (2017) avaliaram a montagem das comunidades bacterianas em função de diferentes usos do solo amazônico (floresta, pastagem e plantio direto) e concluíram que as comunidades de pastagem seguiram o modelo neutro, indicando alta seleção de homogeneização com dispersão moderada, levando à homogeneização biótica, enquanto que as comunidades de plantio direto e solo florestal seguiram um modelo de nicho, com baixas taxas de dispersão e seleção de homogeneização fraca, resultando na manutenção da maior diversidade beta em relação às pastagens, o que indica especialização em nicho ou seleção de variáveis.

Apesar da indiscutível contribuição de todos os estudos de mudança de uso do solo na Amazônia até o momento, é preciso considerar que floresta, áreas agrícolas e pastagens tem estruturas de funcionamento totalmente distintas. Uma das principais diferenças é que a floresta é totalmente dependente da ciclagem de nutrientes do solo, já sistemas agrícolas manejados, por exemplo, recebem adubação. Sendo assim, o compartimento orgânico do solo necessita de mais atenção nos estudos de ecologia microbiana. Recentemente, Rocha et al., (2021) reconheceram a importância das camadas orgânicas na Amazônia e as incluíram nas análises de diversidade microbiana. Essas

camadas incrementam os valores de todas as escalas de diversidade microbiana do solo e foram fundamentais para perceber que a floresta apresenta maior *turnover* da comunidade microbiana (diversidade beta) em relação à áreas convertidas em pastagens. Apesar de não focar na mudança do uso do solo, Ritter et al., 2018 também deram atenção às comunidades da serapilheira e ambos os estudos reconheceram que esse compartimento deve ser incluído nas análises de diversidade do solo.

2.2 Camadas orgânicas do solo e microrganismos

Na Bacia Amazônica, parte dos solos são arenosos e de baixa fertilidade, o que levou as florestas a desenvolverem mecanismos de conservação dos nutrientes disponibilizados pela mineralização da serapilheira. Um desses mecanismos é o desenvolvimento de raízes finas (≤ 2 mm de diâmetro) em meio à serapilheira como forma de evitar a perda de nutrientes por lixiviação e complexação no solo mineral (HERRERA et al., 1978b; STARK; JORDAN, 1978). Essa rede de raízes também pode contribuir para o acúmulo de matéria orgânica no topo dos solos arenosos, pois sua taxa de decomposição é mais baixa nessa textura, quando comparada a solos argilosos (SILVER et al., 2005) e porque florestas de solos arenosos atribuem mais biomassa, comprimento e área de superfície às raízes finas por meio de um crescimento mais rápido (HUASCO et al., 2021). A rizosfera, estreita zona de solo que circunda e é influenciada pelas raízes das plantas, abriga um elevado número de microrganismos, sendo considerada uma das interfaces mais dinâmicas da Terra (PHILIPPOT et al., 2013). Juntamente com a rizosfera, a serapilheira (ou detritosfera) é considerada um *hotspot* microbiano (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015), e assim, presume-se que grande parte das interações planta-microrganismos, bem como interações entre os microrganismos, concentra-se nas camadas orgânicas da floresta.

Associações micorrízicas foram atribuídas como outro mecanismo de conservação de nutrientes na Amazônia. Herrera et al., (1978a), em estudo com folhas marcadas com ^{32}P , observaram que esse elemento foi transferido para raízes vivas através das hifas fúngicas, indicando a importância dessa associação para ambientes oligotróficos. Com o avanço dos estudos de ecologia microbiana, cada vez mais foi sendo relacionado o papel de microrganismos benéficos do solo na nutrição de plantas em ambientes limitados nutricionalmente, por exemplo, através da bactérias fixadoras de N e solubilizadoras de fosfato.

O horizonte orgânico do solo é constituído pela serapilheira e os produtos de sua decomposição, que podem acumular-se ou não no topo do solo em diferentes camadas. Essas camadas podem ser caracterizadas como: camada L, de “litter”, representando o material orgânico recém depositado; camada F, de “fragmented”, composta por material fragmentado, mas ainda reconhecível, e matéria orgânica fina; e camada H, de “humus”, composta majoritariamente por matéria orgânica fina, mas também podem ser observadas raízes finas (KINDEL; GARAY et al. 2002; ZANELLA et al., 2011). O acúmulo da serapilheira no solo depende de um conjunto de fatores bióticos e abióticos que vão favorecer ou não a decomposição completa do material orgânico. O clima é um importante preditor regional para as taxas de decomposição e acúmulo da serapilheira, entretanto, outros fatores podem desempenhar um papel local nesse processo, como tipo de solo, comunidade de organismos decompositores e qualidade da serapilheira (PONGE, 2003; OLIVEIRA et al., 2019).

As camadas orgânicas do solo são importantes reservatórios de C orgânico e fonte de nutrientes para a manutenção da produtividade das florestas (SAYER, 2006; PAN et al., 2011; PRESCOTT; GRAYSTON, 2013), assim, tendem a desempenhar um papel cada vez mais importante no estudo dos ecossistemas florestais, pois são o local das principais interações entre os componentes bióticos e abióticos (ANDREETTA et al., 2013). Em regiões de clima frio (temperado e boreal), onde frequentemente ocorre um grande acúmulo de material orgânico sobre o solo, as camadas orgânicas, juntamente com a porção superior do horizonte mineral A, são classificados em diferentes tipos de formas de húmus (ZANELLA et al., 2011), que podem ser definidas como padrões morfológicos observados na associação de matéria orgânica com matéria mineral no topo dos perfis de solo (PONGE et al., 2003). De maneira análoga à classificação dos solos, existem diferentes tipos de formas de húmus (por exemplo, Mull, Moder e Mor) que podem ser classificados com base na espessura das camadas orgânicas e propriedades do horizonte A (GREEN et al., 1993; ZANELLA et al., 2011). Raros estudos no Brasil utilizaram essa abordagem (KINDEL; GARAY, 2002), que pode ser importante para traçar estratégias de manejo de nutrientes dos ecossistemas florestais e do armazenamento do C orgânico do solo (PONGE et al., 2003; ANDREETTA et al., 2011; DE NICOLA et al., 2014; ANDREETTA et al., 2018).

Os microrganismos do solo são sensíveis à mudanças ambientais, portanto, alterações na floresta podem influenciar suas comunidades e, conseqüentemente, os processos por eles realizados (RODRIGUES et al., 2013; PAULA et al., 2014; LIU et al.,

2018). A comunidade de plantas, através da quantidade e qualidade da serapilheira fornecida, pode influenciar diretamente na comunidade de bactérias e fungos (ZHENG et al., 2018; NIE et al., 2021), o que é frequentemente observado nos estudos de mudança de uso do solo na Amazônia. A qualidade da serapilheira pode se referir, por exemplo, à razão C/N, razão N/lignina e conteúdo de lignina, afetando bactérias e fungos de formas distintas devido às suas diferentes capacidades metabólicas em degradar materiais mais ou menos lábeis, embora possa haver sobreposição de nichos entre esses grupos (BANERJEE et al., 2016). Os fungos são considerados os principais agentes microbianos decompositores, principalmente pela sua elevada eficiência em degradar substratos de baixa qualidade e também mais recalcitrantes, como a lignina (OSONO, 2007). Bactérias também participam ativamente desse processo e, apesar de serem mais eficientes na degradação de compostos lábeis, alguns grupos bacterianos conseguem utilizar substratos recalcitrantes (GOLDFARB et al., 2011).

A comunidade de microrganismos da serapilheira é dinâmica e complexa, ocorrendo uma sucessão de comunidades microbianas ao longo da decomposição, uma vez que a química do substrato varia (BALDRIAN et al., 2012). Heijboer et al. (2018) verificaram que o C derivado da serapilheira fluía sucessivamente entre grupos microbianos do solo (fungos > bactérias Gram negativas > bactérias Gram positivas ≥ actinobactérias > microfauna). PuraHong et al. (2016) também encontraram uma sucessão clara de bactérias e fungos durante a decomposição, onde inicialmente, a comunidade foi dominada por ascomicetos típicos de filosfera, em seguida por ascomicetos especializados em substratos como celulose, hemicelulose, pectina e/ou quitina e, na fase posterior da decomposição, representantes de Basidiomycota, especializados em decompor substratos recalcitrantes como a lignina e substâncias húmicas, foram dominantes. As bactérias iniciais também relacionaram-se com comunidades típicas de filosfera, como membros de *Frigoribacterium* e *Sphingomona* (BODENHAUSEN et al., 2013; LOPEZ-GUERRERO et al., 2013), onde algumas persistiram até o estágio posterior da decomposição (PURA HONG et al., 2016).

Diante da dinâmica das comunidades microbiana e das variações das características químicas das camadas orgânicas (por exemplo, conteúdo de matéria orgânica e nutrientes), já foi observado que as comunidades dessa região podem ser diferentes daquelas encontradas no solo mineral (BALDRIAN et al., 2012; LUO et al.,

2021) e, frente à intensa mudança no uso do solo das florestas tropicais, essas comunidades estão fortemente ameaçadas.

2.3 Fungos micorrízicos arbusculares

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao filo Glomeromycota (REDECKER et al., 2013) e representam uma das simbioses mais importantes para a produtividade de plantas terrestres (SIQUEIRA; SAGGIN-JÚNIOR, 2001; HEIJDEN et al., 2015). Esses fungos são biotróficos obrigatórios associando-se às raízes da maior parte das espécies vegetais vasculares. Os FMA colonizam o córtex da raiz, formando estruturas especializadas, os arbúsculos, que atuam como uma interface de troca com o hospedeiro. Ao mesmo tempo, o fungo desenvolve uma densa rede de hifas extrarradiculares, que o possibilita explorar um grande volume de solo. Também pode haver a participação de outras estruturas próprias da associação, como vesículas e células auxiliares relacionadas ao armazenamento de nutrientes (SMITH; READ, 2008). Nessa endossimbiose, as plantas fornecem aos fungos uma fração considerável de fotoassimilados (BAGO et al., 2000) e, em troca, os FMA melhoram a absorção de nutrientes pelo hospedeiro, principalmente de P e N, diminuindo consideravelmente as perdas desses elementos por lixiviação (ASGHARI et al., 2005;2012; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2017). Outros benefícios às plantas podem ser citados, como o aumento da absorção de água e resistência contra patógenos (SMITH; READ, 2006).

Apesar de não serem conhecidos como saprófitas, tem sido relatado que os FMA podem ter uma participação indireta na decomposição da serapilheira, por exemplo, beneficiando microrganismos decompositores por meio da liberação de C lábil em sua hifosfera (região próxima às hifas) (HERMAN et al., 2012). De fato, alguns estudos já observaram esses fungos colonizando matéria orgânica em decomposição e até mesmo folhas não decompostas tanto de florestas quanto de sistemas agrícolas (ARISTIZÁBAL et al., 2003; CAMENZIND; RILLIG, 2013; BUNN et al., 2019; DÍAZ-ARIZA et al., 2021).

O estabelecimento da simbiose e composição das comunidades de FMA são sensíveis às condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutriente como P e N, pH do solo e intensidade do uso da terra (OEHL et al., 2010; BALZERGUE et al., 2013; BONNEAU et al., 2013). Por exemplo, quando P foi disponibilizado no solo, houve inibição da simbiose (BALZERGUE et al., 2013). Moora et al. (2014) encontraram comunidades distintas de FMA entre áreas de florestas, pastagens e agricultura,

observando que taxa de Glomeraceae serviram como indicadores para habitats não perturbados, enquanto taxa de Archaeosporaceae, Claroideoglomeraceae e Diversisporaceae foram indicadores dos habitats perturbados. Estudos na Amazônia também mostraram a mudança na composição de fungos com a conversão floresta-pastagem (por exemplo, LEAL et al, 2013). O uso do fogo é geralmente praticado na conversão de sistemas de floresta para pastagens ou agricultura e incêndios podem ser mais recorrentes frente às mudanças climáticas. Foi observado que, um ano após incêndios de baixa intensidade em uma floresta da China, a composição da comunidade FMA, a diversidade alfa e a estrutura filogenética foram significativamente alteradas (XIANG et al., 2015b). No entanto, as comunidades de FMA eram indistinguíveis dos solos florestais não queimados 11 anos após o incêndio, indicando que esses fungos são resilientes à ação do fogo a longo prazo. Essa resiliência é imprescindível para a manutenção da diversidade de FMA em usos distintos de solos (STÜRMER; SIQUEIRA, 2011).

2.4 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio (N) é considerado um elemento essencial para o desenvolvimento dos seres vivos. A ciclagem de N em ambientes terrestres é mediada por microrganismos que desempenham processos específicos como, por exemplo, fixação biológica, nitrificação, desnitrificação e redução dissimilatória de nitrato a amônio (LEVY-BOOTH et al., 2014).

As florestas tropicais são frequentemente caracterizadas por um ciclo do N microbiano dinâmico, com níveis relativamente altos de perda de N via desnitrificação (TOWNSEND et al., 2011) equilibrados por altos níveis de fixação de N (REED et al., 2007; CUSACK et al., 2009). Embora esses ecossistemas ocupem apenas 12% da superfície da Terra, contribuem com, aproximadamente, 70% da fixação terrestre de N e emitem cerca de 50% do óxido nitroso (N₂O) (TOWNSEND et al., 2011).

Ao longo de muitos anos, acreditou-se que membros do domínio Bacteria eram os principais contribuintes para o ciclo do nitrogênio. No entanto, a contribuição dos domínios Archaea e Eukarya na transformação do nitrogênio foi observada, onde fungos filamentosos e arqueias mostraram estar envolvidos tanto na nitrificação como na desnitrificação (HAYATSU et al., 2008).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser considerada o primeiro passo do ciclo global do nitrogênio (RAYMON et al., 2004) e consiste na conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) a amônio (NH_4^+), catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. A FBN é responsável por, aproximadamente, dois terços do nitrogênio fixado no planeta (RUBIO; LUDDEN, 2008) e é realizada por microrganismos denominados diazotróficos. Esse processo é restrito aos domínios Bacteria e Archaea (DIXON; KAHN, 2004; MARTINEZ-ROMERO, 2006). As bactérias diazotróficas são as principais responsáveis pelo suprimento de N nas florestas tropicais, com domínio das que realizam simbiose com plantas da família Fabaceae, formando nódulos radiculares, e das de vida livre no solo, na serapilheira e na filosfera do dossel da floresta (BARROS et al., 2018; MOREIRA et al., 2021).

A comunidade diazotrófica pode ser estudada através dos genes *nif* que codificam as subunidades do complexo da nitrogenase. O gene *nifH* codifica a subunidade da nitrogenase redutase e se tornou o gene marcador para estudos de filogenia, diversidade e abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio (GABY; BUCKLEY, 2012).

A nitrificação é um processo de oxidação do amônio (amônia, em termos de substrato) para nitrito (NO_2^- - etapa da nitrificação) e, subsequentemente, para nitrato (NO_3^- - etapa da nitratação) realizado por microrganismos quimioautotróficos (nitrificação classificada como autotrófica), que obtêm o C do CO_2 e a energia da oxidação química para a síntese de seus constituintes celulares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na nitrificação autotrófica, a oxidação da amônia é catalisada pela monooxigenase da amônia (AMO), codificada pelo gene *amoA*, e é considerada uma etapa limitante desse processo (LI et al., 2015). Desse modo, o gene *amoA* é o mais utilizado para estudos moleculares da nitrificação. Inicialmente, acreditava-se que a nitrificação poderia ser realizada apenas por bactérias oxidantes de amônia (AOB). Posteriormente, observou-se a presença do gene *amoA* em arqueias, comprovando que também são capazes de conduzir a primeira etapa da nitrificação (KÖNNEKE et al., 2005; BROCHIER-ARMANET et al., 2008; VIEIRA, 2017).

O processo de nitrificação sempre foi considerado resultante de duas etapas realizadas por distintos microrganismos: a oxidação da amônia para nitrito (nitrificação) e a oxidação do nitrito a nitrato (nitratação). Porém, estudos recentes comprovaram a existência de bactérias pertencentes ao gênero *Nitrospira* capazes de mediar todo o processo de nitrificação. Foi observado que no genoma das espécies avaliadas havia a presença dos genes envolvidos no processo de nitrificação e nitratação (DAIMS et al., 2015;

KESSEL et al., 2015). O processo completo da nitrificação é denominado *comammox* (*complete ammonia oxidizer* – oxidador completo da amônia).

Além da nitrificação autotrófica, alguns microrganismos são capazes de oxidar N orgânico a nitrato, realizando, então, a nitrificação heterotrófica. Alguns estudos sugerem que os nitrificadores heterotróficos também podem utilizar substratos inorgânicos (ZHANG et al., 2014) e alguns representantes são: as bactérias *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus denitrificans*; e os fungos filamentosos *Aspergillus wentii* e *Penicillium sp.* (HAYATSU et al., 2008; VIEIRA, 2017).

Quando disponível no solo, o NO_3^- pode ser assimilado, perdido por lixiviação ou utilizado por microrganismos como acceptor final de elétrons em duas diferentes vias respiratórias: desnitrificação ou redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA) (PUTZ et al., 2018).

A desnitrificação é responsável pela redução sequencial de nitrato ou nitrito a N_2 , através dos intermediários NO e N_2O . É o principal processo biológico do solo que devolve o N fixado pelos processos anteriores à atmosfera e, também, a principal via do solo de emissões de NO e N_2O (PHILIPPOT et al., 2007; HOULTON; BAI, 2009; PAJARES; BOHANNAN, 2016).

Várias enzimas estão envolvidas no processo de desnitrificação e seus respectivos genes são utilizados como marcadores genéticos para estudos de microrganismos desnitrificantes como: *narG* e *napA* (codifica a nitrato redutase), *nirK* e *nirS* (nitrito redutase), *norB* (óxido nítrico redutase) e *nosZ* (óxido nitroso redutase) (LAMMEL et al., 2015). A nitrito redutase é a enzima chave da desnitrificação, pois catalisa a redução do NO_2^- aos produtos gasosos (HENRY et al., 2004). Os solos tropicais são considerados as maiores fontes naturais de NO e N_2O devido à combinação de fatores climáticos, propriedades do solo e taxas rápidas de ciclagem de N (DAVIDSON et al., 2001; NEILL et al., 2005; STEHFEST; BOUWMAN, 2006; PAJARES; BOHANNAN, 2016). O N_2O emitido do solo é particularmente preocupante pois é um gás com alta capacidade de contribuir para o efeito estufa, que pode ser até 296 vezes superior a capacidade do CO_2 .

Um outro mecanismo biológico já relatado em solos tropicais (ZHANG et al., 2014), mas que ainda necessita de maiores elucidacões, é a Redução Dissimilatória de Nitrato a Amônio (DNRA). Como o próprio nome sugere, nesse processo há a conversão de nitrato a nitrito e, posteriormente, a amônio. No solo, a DNRA pode ser realizada por bactérias anaeróbicas obrigatórias (*Clostridium*), anaeróbicas facultativas (*Enterobacter*,

Klebsiella, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*) e aeróbicas (*Pseudomonas*, *Arrobacter*), incluindo algumas espécies de rizóbio (VIEIRA, 2017). O gene considerado chave para o estudo da DRNA é o *nrfA*, que codifica a enzima nitrito redutase.

A DNRA é considerada como uma forma de conservação do N no solo, visto que o cátion amônio é mais estável e, portanto, menos móvel. Apesar da conservação de N, na DRNA também há liberação de N_2O (COLE, 1988), mas sugere-se que essa liberação seja um mecanismo de desintoxicação, a fim de evitar altas concentrações de NO_2^- (RÜTTING et al., 2011).

A DRNA ainda é um processo pouco considerado nos estudos do ciclo de nitrogênio, entretanto diversos trabalhos já observaram a abundância do gene *nrfA* em diferentes ambientes, geralmente contrastando com a ocorrência da desnitrificação (TEMPLER et al., 2008; PUTZ et al., 2018). Os resultados ainda são contraditórios e os fatores que podem influenciar a DNRA ainda não estão bem definidos, mas, em suma, sugere-se que o potencial redox e a relação C/NO_3^- exercem influência na dinâmica da DRNA (RÜTTING et al., 2011). Alguns estudos relatam que a ocorrência de DNRA é geralmente favorecida por condições redox baixas e flutuantes, como as encontradas em solos de florestas tropicais úmidas (PAJARES. BOHANNAN, 2016).

A utilização de genes marcadores para o estudo da abundância relativa de grupos do ciclo do nitrogênio, assim como de outros ciclos, é bastante difundida. Além disso, é possível a observação de um panorama acerca do predomínio de determinados grupos em detrimento a outros e do estabelecimento de correlações entre abundância e características do ambiente como pH, C orgânico, precipitação, entre outros. Porém, vale ressaltar que ambientes como solos de florestas tropicais são altamente dinâmicos e que as taxas de muitos processos do N mediados por microrganismos mostram variação substancial em pequenas escalas temporais e espaciais (SILVER et al., 2001; DAVIDSON et al., 2004; PETT-RIDGE et al., 2006).

2.5 Biologia molecular no estudo de ecologia microbiana

As técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da ecologia de microrganismos têm revelado a existência de uma grande biodiversidade ainda não caracterizada em diferentes ambientes (LAMBAIS et al., 2001). Muitas espécies procarióticas e eucarióticas não podem ser isoladas facilmente de amostras ambientais ou não podem ser cultivadas *in vitro*. Para se conhecer a diversidade e atividade das espécies microbianas no solo, assim como sua diversidade funcional em resposta a diferentes

fatores ambientais, foi necessário o desenvolvimento de novas abordagens adaptadas a estes organismos. Assim, a metagenômica aparece como uma ferramenta extremamente poderosa para estes estudos.

A metagenômica baseia-se no estudo do genoma de uma comunidade microbiana sem a necessidade de cultivos *in vitro*, ou seja, é uma técnica independente de cultivo. Na metagenômica é realizada a extração direta de DNA de amostras ambientais que, de modo geral, são submetidas a sequenciamento de parte ou de todo o genoma, o que permite a construção de bibliotecas genômicas que servem como base para estudos filogenéticos.

O método de terminação de cadeia de Sanger, publicado em 1977, foi o primeiro método popular de sequenciamento de DNA. Nesse método, o sequenciamento é realizado a partir de uma fita simples do DNA, obtida por desnaturação da molécula nativa, que é utilizada como molde para geração da fita complementar (SANGER; NICKLEN, 1977). Por meio de fluorescência, o último nucleotídeo incorporado na extremidade do alongamento da cadeia é detectado na etapa de análise (FIGUEIREDO et al., 2010).

Por muito tempo, o método de Sanger dominou os estudos de sequenciamento, mas, a partir dos anos 2000, surgiram novos sequenciadores denominados “sequenciadores de nova geração” (NGS). Em 2004 foi lançado pela Roche o sequenciador 454, que realizava o pirosequenciamento, um tipo de sequenciamento baseado em síntese (RONAGHI et al., 1998). Desde então, as tecnologias de sequenciamento de DNA foram cada vez mais aperfeiçoadas, o que, conseqüentemente, aumentou a capacidade de geração de sequências e otimizou custos e tempo empregados. As metodologias de NGS são capazes de fornecer uma grande quantidade de informações, desde relações filogenéticas, descoberta de novos genes e dedução de vias metabólicas em bactérias não cultiváveis (PESSOA FILHO, 2010). Atualmente, existem diferentes sequenciadores no mercado e que realizam o sequenciamento do DNA por diferentes métodos. Uma tecnologia bastante utilizada é a Illumina, que realiza o sequenciamento por síntese, onde, simplificada, uma fita simples do DNA de interesse é ligada a adaptadores em uma placa (*flowcell*) formando uma estrutura de ponte. Essa fita passa por amplificação por PCR (*bridge-PCR*) formando aglomerados de sequências iguais ou próximas, denominado *clusters*. Uma enzima de linearização separa as fitas duplas de DNA formadas e inicia-se o sequenciamento com a adição de nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos para cada base (além de *primers* e DNA

polimerase). Ao passo que uma base é adicionada à sequência, o terminador com o fluoróforo são clivados para a incorporação da próxima base. O fluoróforo clivado emite um sinal indicando que sua base correspondente foi adicionada (SHENDURE; JI, 2008).

Em estudos de sequenciamento de amplicon de procariotos, o gene 16S rRNA é frequentemente utilizado. A região codificadora do 16S rRNA apresenta diversas porções, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis, numeradas de 1 a 9 (V1 a V9), que são diversificadas entre as espécies bacterianas. Assim, essas sequências se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (LIU; STAHL, 2002). O 16S rRNA (~1500 nucleotídeos) gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar do 23S rRNA (~3000 nucleotídeos) conter duas vezes mais informações e, portanto, gerar maior acurácia nas inferências, a molécula menor, por causa da maior facilidade de sequenciamento, tornou-se referência (STAHL, 1997). Atualmente, existem diferentes bancos de dados públicos com um grande número de sequências de 16S rRNA disponíveis, o que também favorece a utilização desse gene como marcador molecular. Alguns exemplos desses bancos de dados são: RDP - Ribossomal Database Project (rdp.cme.msu.edu, COLE et al., 2014), SILVA (www.arb-silva.de, PRUESSE et al., 2007), NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). A região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico nuclear é o código de barras formal para a identificação molecular de fungos (SCHOCH et al., 2012). A região do ITS abrange de 500 a 700 bases de comprimento, mas a maioria dos estudos enfocam sub-regiões como ITS1 e ITS2 que apresentam de 250 a 400 bases de comprimento (NILSSON et al., 2019a). Para Glomeromycota, o gene 18S rRNA (~500 pares de bases), localizado na subunidade pequena (SSU – *small subunit*), tem sido preferencialmente utilizado como um marcador (ÖPIK et al., 2010), uma vez que o ITS é considerado uma região subótima como marcador para FMA (SCHOCH et al., 2012). Os banco de dados mais utilizados para fungos são o UNITE (unite.ut.ee, NILSSON et al., 2019b) para ITS e SILVA (arb-silva.de, PRUESSE et al., 2007) ou MaarjAM (maarjam.botany.ut.ee, ÖPIK et al., 2010) para 18S.

Apesar da revolução dos métodos de sequenciamento de DNA, as técnicas de biologia molecular tradicionais ainda são bastante difundidas nos estudos de ecologia microbiana, como, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua variante, a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR, também denominada de PCR em tempo real – RT-PCR).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, com a utilização de dois oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers* ou iniciadores, que são complementares a duas regiões específicas do DNA alvo a ser amplificado. Por meio da enzima Taq polimerase (DNA polimerase termoestável) e condições favoráveis para que a reação ocorra, novas fitas complementares ao DNA alvo são sintetizadas. Essa técnica foi desenvolvida nos anos 80 pelo bioquímico Kary B. Mullis, que em 1993, recebeu o prêmio Nobel de Química devido ao grande potencial do trabalho desenvolvido (NOVAIS et al., 2004).

A qPCR é derivada da PCR convencional e representou um salto tecnológico para a pesquisa, devido a sua grande sensibilidade de detecção e a possibilidade de monitorar em tempo real a geração dos produtos da PCR (ANDERSEN et al., 2006). Em relação à PCR convencional, a qPCR apresenta a vantagem do processo de amplificação, detecção e quantificação do DNA ocorrerem em etapa única, reduzindo tempo de análise e risco de contaminação das amostras. Além disso, a qPCR é um método mais preciso (MACKAY et al.; 2002).

A qPCR se torna uma técnica interessante para o estudo de abundância relativa de grupos de microrganismos funcionais do solo por meio da amplificação de genes marcadores que codificam enzimas específicas de determinado processo, como a enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos, por exemplo (MORALES et al., 2010; PETERSEN et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ALLISON, S.D.; MARTINY, J.B.H. **Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities.** PNAS, v. 105, p. 11512–11519, 2008.
- ALONSO, D.; MCKANE, A.J. **Sampling Hubbell's neutral theory of biodiversity.** Ecology Letters, v. 7, p. 901–910, 2004.
- ANDERSEN, C.B. *et al.* **Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.
- ANDREETTA, A. *et al.* **Forest humus forms as potential indicators of soil carbon storage in Mediterranean environments.** Biology and Fertility of Soils, v. 47, p. 31–40, 2011.
- ANDREETTA, A.; CECCHINI, G.; CAMICELLI, S. **Forest humus forms in Italy: a research approach.** Applied Soil Ecology, v. 123, p. 382-390, 2018.
- ANDREETTA, M. *et al.* **Microbial activity and organic matter composition in Mediterranean humus forms.** Geoderma, v. 209, p. 198-208, 2013.
- ARISTIZÁBAL, C.; RIVERA, E. L.; JANOS, D. P. **Arbuscular mycorrhizal fungi colonize decomposing leaves of *Myrica parvifolia*, *M. pubescens* and *Paepalanthus* sp.** Mycorrhiza 2003 14:4, v. 14, n. 4, p. 221–228, 2003.
- ASGHARI, H. R.; CAVAGNARO, T. R. **Arbuscular Mycorrhizas Reduce Nitrogen Loss via Leaching.** PLOS ONE, v. 7, n. 1, p. e29825, 2012.
- ASGHARI, H. R. *et al.* **Influence of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Symbiosis on Phosphorus Leaching through Soil Cores.** Plant and Soil, v. 275, n. 1, p. 181–193, 2005.
- BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. **Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas.** Plant Physiology, v. 124, n. 3, p. 949–958, 2000.
- BALDRIAN, P. *et al.* **Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition.** ISME Journal, v. 6, n. 2, p. 248–258, 2012.
- BALZERGUE, C. *et al.* **High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus.** Frontiers in Plant Science, p. 426, 2013.
- BANERJEE, S. *et al.* **Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter**

decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 97, p. 188–198, 2016.

BARROS, F.M.R. *et al.* **Silvopastoral systems drive the nitrogen-cycling bacterial community in soil.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 42, n. 3, p. 281-290, 2018.

BONNEAU, L. *et al.* **Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*.** *New Phytologist*, v. 199, n. 1, p. 188–202, 2013.

BROCHIER-ARMANET, C. *et al.* **Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 245-252, 2008.

BUNN, R. A. *et al.* **Revisiting the ‘direct mineral cycling’ hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why?** *The ISME Journal*, v. 13, n. 8, p. 1891–1898, 2019.

CAMENZIND, T.; RILLIG, M. C. **Extraradical arbuscular mycorrhizal fungal hyphae in an organic tropical montane forest soil.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 64, p. 96–102, 2013.

CARROLL, I.T.; CARDINALE, B.J.; NISBET, R.M. **Niche and fitness differences relate the maintenance of diversity to ecosystem function.** *Ecology*, v. 92, p. 1157–1165, 2011.

CARVALHO, T. S. *et al.* **Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria.** *Ecology*, v. 97, n. 10, p. 2760–2771, 2016.

CECIANI, 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*, v. 33, p. 907-916, 2009.

CERQUEIRA, A. E. S. *et al.* **Amazon basin pasture soils reveal susceptibility to phytopathogens and lower fungal community dissimilarity than forest.** *Applied Soil Ecology*, v. 131, p. 1–11, 2018.

COLE, J. A. **Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia**, in: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*, edited by: Cole, J. A. and Ferguson, S. J., Cambridge University Press, Cambridge, p. 281–329, 1988.

COLE, J. R. *et al.* **Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis.** *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D633–D642, 2014.

CUSACK, D. F.; SILVER, W.; MCDOWELL, W. H. **Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization.** *Ecosystems*, v. 12, n. 8, p. 1299–1315, 2009.

DA SILVA NETO, E. C. *et al.* **Temporal evaluation of soil chemical attributes after slash-and-burn agriculture in the Western Brazilian Amazon.** Acta Scientiarum. Agronomy, v. 41, n. 1, 2019.

DAIMS, H. *et al.* **Complete nitrification by Nitrospira bacteria.** Nature, v. 7583, n. 528, p. 504-509, 2015.

DAVIDSON, E. A.; BUSTAMANTE, M.M.; DE SIQUEIRA PINTO, A. **Emissions of nitrous oxide and nitric oxide from soils of native and exotic ecosystems of the Amazon and Cerrado regions of Brazil.** Scientific World Journal, 1:312–319, 2001.

DAVISON, E. *et al.* **The Amazon basin in transition.** Nature, v. 481, p. 321–328, 2012.

DE NICOLA, C. *et al.* **Humus forms in a Mediterranean area (Castelporziano Reserve, Rome, Italy): classification, functioning and organic carbon storage.** Geoderma, v. 235, p. 90–99, 2014.

DÍAZ-ARIZA, L. A.; RIVERA, E. L.; SÁNCHEZ, N. **Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in leaf litter and roots of shaded coffee plantations under organic and conventional management.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 45, 2021.

DINI-ANDREOTE, F. *et al.* **Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession.** PNAS, 2015.

DIXON, R.; KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** Nature Reviews Microbiology, v. 2, p. 621-631, 2004.

FERRENBURG, S. *et al.* **Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance.** The ISME Journal. v. 7, n. 6, p. 1102–1111, 2013.

FIGUEIREDO, G.S. *et al.* **Reação de Sequenciamento de DNA e Purificação – Protocolos de Otimização.** Circular Técnica n. 22, EMBRAPA, 2010.

FRACETTO, G. G. M. *et al.* **Impact of amazon land use on the community of soil fungi.** Scientia Agricola, v. 70, n. 2, p. 59–67, 2013.

FRANCO, A. L. C. *et al.* **Amazonian deforestation and soil biodiversity.** Conservation Biology, v. 33, n. 3, p. 590–600, 2019.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. **A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifh* gene of nitrogenase.** PLOS ONE, v. 7, n. 7, p. 42149, 2012.

GOLDFARB, K. C. *et al.* **Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance.** Frontiers in Microbiology, p. 94, 2011.

- GOSS-SOUZA, D. *et al.* **Ecological processes shaping bulk soil and rhizosphere microbiome assembly in a long-term Amazon forest-to-agriculture conversion.** *Microbiol Ecology*, v. 79, p. 110-122, 2020.
- GOSS-SOUZA, D. *et al.* **Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change.** *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 93, fix109, 2017.
- GREEN, R.N.; TROWBRIDGE, R.L.; KLINKA, K. **Towards a taxonomic classification of humus forms.** *For. Sci. Monogr.*, v. 29, p. 1-48, 1993.
- HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. **Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification.** *Soil Science and Plant Nutrition*, 54:33-45, 2008.
- HEIJBOER, A. *et al.* **Modulation of litter decomposition by the soil microbial food web under influence of land use change.** *Frontiers in Microbiology*, p. 2860, 2018.
- HEIJDEN, M. G. A. VAN DER *et al.* **Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future.** *New Phytologist*, v. 205, n. 4, p. 1406–1423, 2015.
- HERRERA, R.; KLINGE, H.; MEDINA, E. **Amazon ecosystems: their structure and functioning with particular emphasis on nutrients.** *Interciencia*, v. 3, n. 4, p. 223–231, 1978b.
- HERRERA, R. *et al.* **Direct phosphorus transfer from leaf litter to roots.** *Naturwissenschaften*, v. 65, n. 4, p. 208–209, 1978a.
- HERMAN, D. J. *et al.* **Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, n. 1, p. 236–247, 2012.
- HOULTON, B.Z.; BAI, E. **Imprint of denitrifying bacteria on the global terrestrial biosphere.** *PNAS*, v. 106, p. 21713–21716, 2009.
- HUASCO, W. H. *et al.* **Fine root dynamics across pantropical rainforest ecosystems.** *Global Change Biology*, v. 27, n. 15, p. 3657–3680, 2021.
- HUBBELL, S.P. **The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography.** Princeton: Princeton University Press, 2001.
- JAKOVAC, C. C. *et al.* **Loss of secondary-forest resilience by land-use intensification in the Amazon.** *Journal of Ecology*, v. 103, n. 1, p. 67–77, 2015.
- JESUS, E.D. *et al.* **Changes in land use alter the structure of bacterial communities in western Amazon soils.** *The ISME Journal*, v. 3, p. 1004-1011, 2009.
- JUO, A.S.; MANU, R.A. **Chemical dynamics in slash-and-burn agriculture.** *Agriculture, Ecosystems & Environmental*, v. 58, p. 49–60, 1996.

- KESSEL, M. A. H. J. *et al.* **Complete nitrification by a single microorganism.** *Nature*, v. 528, n. 7583, p. 555-559, 2015.
- KINDEL, A.; GARAY, I. **Humus form in ecosystems of the Atlantic Forest, Brazil.** *Geoderma*, v. 108, p. 101–118, 2002.
- KÖNNEKE, M. *et al.* **A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon.** *Nature*, v. 437, n. 7058, p. 543-546, 2005.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. **Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 83, p. 184–199, 2015.
- LAMBAIS, M.R. *et al.* **Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas.** *Tópicos em Ciência do Solo*, v. 4, p. 43-84, 2005.
- LAMMEL, D.R. *et al.* **Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and Cerrado (Brazilian Savannah) biomes in Southern Amazonia.** *European Journal of Soil Biology*, v. 66, p 32–39, 2015.
- LEAL, P. L.; SIQUEIRA, J. O.; STÜRMER, S. L. **Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community.** *Applied Soil Ecology*, v. 71, p. 72–80, 2013.
- LEAL, P. L.; STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. **Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 111–121, 2009.
- LEMOS, L. N. *et al.* **Amazon deforestation enriches antibiotic resistance genes.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 153, p. 108110, 2021.
- LEVY-BOOTH, D.J.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. **Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 75, p. 11–25, 2014.
- LI, J.; NEDWELL, D.B. *et al.* **Abundances and nitrification potential rates suggest that benthic ammonia-oxidizing bacteria not archaea dominate N cycling in the colne estuary, United Kingdom.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 1, p. 159-165, 2015.
- LIU, W.T.; STHAL, D.A. **Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity and Phylogeny.** In: *Manual of Environmental Microbiology*, p.114, 2002.
- MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E., NITSCHKE, A. **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 1292-1305, 2002.
- LIU, Y.; ZHANG, J. *et al.* **Canopy gaps accelerate soil organic carbon retention by soil microbial biomass in the organic horizon in a subalpine fir forest.** *Applied Soil Ecology*, v. 125, p. 169–176, 2018.

- LUCHETA, A.R. *et al.* **Fungal community assembly in the amazonian dark earth.** *Microbial Ecology*, v. 71, n. 4, p. 962–973, 2016.
- LUO, X. *et al.* **Fungal community composition and diversity vary with soil horizons in a subtropical forest.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 650440, 2021.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, L. B. *et al.* **Symbiotic soil fungi enhance ecosystem resilience to climate change.** *Global Change Biology*, v. 23, n. 12, p. 5228–5236, 2017.
- MARTINEZ-ROMERO, E. **Dinitrogen-fixing prokaryotes.** In: ROSENBERG, E.; DeLONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Ed.). *Prokaryotes*. Berlin: Springer, v. 2, p. 798-817, 2006.
- MCGUIRE, K. L. *et al.* **Fungal Community Composition in Neotropical Rain Forests: The Influence of Tree Diversity and Precipitation.** *Microbial Ecology*, v. 63, n. 4, p. 804–812, 2012.
- MELO, V. F. *et al.* **Soil bacterial diversities and response to deforestation, land use and burning in North Amazon, Brazil.** *Applied Soil Ecology*, v. 158, p. 103775, 2021.
- MENDES, L.W. *et al.* **Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region.** *Applied Soil Ecology*, v. 95, p. 151–60, 2015b.
- MENDES, L.W. *et al.* **Soil-borne microbiome: linking diversity to function.** *Microbial Ecology*, v. 70, p. 255–65, 2015b.
- MENDES, L.W. *et al.* **Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere.** *The ISME Journal*, p. 1-11, 2014.
- MERLOTI, L.F. *et al.* **Forest-to-agriculture conversion in Amazon drives soil microbial communities and n-cycle.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 137, 2019.
- MOORA, M. *et al.* **Anthropogenic land use shapes the composition and phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 90, n. 3, p. 609–621, 2014.
- MORALES, S.; COSART, T.; ANDHOLBEN, W. **Bacterial gene abundances as Indicators of greenhouse gas emission in soils.** *The ISME Journal*, v. 4, p. 799–808, 2010.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo.** Editora: UFLA, 2ª ed. 729, 2006.
- MOREIRA, J.C.F. *et al.* **Asymbiotic nitrogen fixation in the phyllosphere of the Amazon forest: Changing nitrogen cycle paradigms.** *Science of the Total Environment*, v. 773, 145066, 2021.

- MUELLER, R. C. *et al.* **Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest.** *The ISME Journal*, v. 8, n. 7, p. 1548–1550, 2014.
- MUELLER, R. C. *et al.* **Land use change in the Amazon rain forest favours generalist fungi.** *Functional Ecology*, v. 30, n. 11, p. 1845–1853, 2016.
- MUNDRA, S. *et al.* **Soil depth matters: shift in composition and inter-kingdom co-occurrence patterns of microorganisms in forest soils.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 3, 2021.
- NAVARRETE, A. A. *et al.* **Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 108, p. 741-752, 2015b.
- NAVARRETE, A. A. *et al.* **Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils.** *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 83, p. 607–621, 2013.
- 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*, v. 6, 2015c.
- NAVARRETE, A. A. *et al.* **Land-use systems affect archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soil.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 1527-1540, 2011.
- NAVARRETE, A. A. *et al.* **Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation.** *Molecular Ecology*, v. 24, p. 2433-2448, 2015a.
- NEILL, C. *et al.* **Rates and controls of nitrous oxide and nitric oxide emissions following conversion of forest to pasture in Rondônia.** *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 71, p. 1–15, 2005.
- NIE, H. *et al.* **How do tree species characteristics affect the bacterial community structure of subtropical natural mixed forests?** *Science of the Total Environment*, v. 76, p. 144633, 2021.
- NILSSON, R. H. *et al.* **Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 95–09, 2019a.
- NILSSON, R. H. *et al.* **The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications.** *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D259–D264, 2019b.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. **PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR).** *Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento*, 33^a ed., 2004.

- OEHL, F. *et al.* **Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 724–738, 2010.
- OLDEN, J. D. *et al.* **Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization.** *Trends in Ecology & Evolution*, v. 19, n. 1, p. 18–24, 2004.
- OLIVEIRA, R. A. C.; MARQUES, R.; MARQUES, M. C. M. **Plant diversity and local environmental conditions indirectly affect litter decomposition in a tropical forest.** *Applied Soil Ecology*, v. 134, p. 45–53, 2019.
- ÖPIK, M. *et al.* **The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota).** *New Phytologist*, v. 188, p. 223–241, 2011.
- OSONO, T. **Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition.** *Ecological Research* 2007 22:6, v. 22, n. 6, p. 955–974, 2007.
- PAJARES, S.; BOHANNAN, B.J.M. **Ecology of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microorganisms in tropical forest soils.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, P 1045, 2016.
- PAN, Y. *et al.* **Large and persistent carbon sink in the world's forests.** *Science*, v. 333, n. 6045, p. 988–993, 2011.
- PAULA, F.S. *et al.* **Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities.** *Molecular Ecology*, v. 23, p. 2988–2999, 2014.
- PEAY, K. G.; BARALOTO, C.; FINE, P. V. **Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests.** *The ISME Journal*, v. 7, n. 9, p. 1852–1861, 2013.
- PEDRINHO, A. *et al.* **Forest-to-pasture conversion and recovery based on assessment of microbial communities in Eastern Amazon rainforest.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 95, n. 3, p. 236, 2019.
- PEREIRA, C. M. R. *et al.* **Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses.** *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 185, p. 245–252, 2014.
- PESSOA FILHO, M.A.C.P. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 29 p, 2010 (Embrapa Cerrados, Documentos 284).
- PETERSEN, D.G. *et al.* **Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska.** *Environmental Microbiology*, v. 14, p. 993–1008, 2012.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SCHLOTTER, M. **Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil.** *Advances in Agronomy*, v. 96, p. 249–305, 2007.

PHILIPPOT, L. *et al.* **Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 789–799, 2013.

PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. **Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs.** *Forest Ecology and Management*, v. 309, p. 19–27, 2013.

PRUESSE, E. *et al.* **A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB.** *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

PURAHONG, W. *et al.* **Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition.** *Molecular Ecology*, v. 25, n. 16, p. 4059–4074, 2016.

PUTZ, M. *et al.* **Relative abundance of denitrifying and DNRA bacteria and their activity determine nitrogen retention or loss in agricultural soil.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 123, p. 97–104, 2018.

RAJAN, K. *et al.* **Forest-to-pasture conversion increases the diversity of the phylum Verrucomicrobia in Amazon rainforest soils.** *Frontier in Microbiology*, v. 6, p. 779, 2015.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R. **The natural history of nitrogen fixation.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, p. 541–554, 2004.

REDECKER, D. *et al.* **An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota).** *Mycorrhiza*, v. 23, n. 7, p. 515–531, 2013.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. **Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests.** *Biotropica*, v. 39, n. 5, p. 585–592, 2007.

RITTER, C. D. *et al.* **High-throughput metabarcoding reveals the effect of physicochemical soil properties on soil and litter biodiversity and community turnover across Amazonia.** *PeerJ*, e5661, 2018.

ROCHA, F. I. *et al.* **Land-use system and forest floor explain prokaryotic metacommunity structuring and spatial turnover in Amazonian forest-to-pasture conversion areas.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 657508, 2021.

RODRIGUES, J. L. M. *et al.* **Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities.** *PNAS*, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

RUBIO, L.M.; LUDDEN, P.W. **Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase.** Annual Review of Microbiology, v. 62, p. 93-111, 2008.

RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYEREN, P. **A sequencing method based on real-time pyrophosphate.** Science, v. 281, n. 5375, p. 363-365, 1998

SALA, O.E. *et al.* **Global biodiversity scenarios for the year 2100.** Science, v. 287, p. 1770–1774, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174).** PNAS, v. 74, n. 12, 1977.

SAYER, E. J. **Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems.** Biological Reviews, v. 81, n. 1, p. 1–31, 2006.

SCHOCH, C. L. *et al.* **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** PNAS, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SHENDURE, J.; Ji, H. **Next-generation DNA sequencing.** Nature Biotechnology, v. 26, p. 101135-1145, 2008.

SILVER, W. L. *et al.* **Fine root dynamics and trace gas fluxes in two lowland tropical forest soils.** Global Change Biology, v. 11, n. 2, p. 290–306, 2005.

SMITH, S.E., READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 3rd edn. Academic, London, 2008.

SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. **Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species.** Mycorrhiza, v. 11, n. 5, p. 245–255, 2001.

SOUZA-JUNIOR, C.M.; *et al.* **Reconstructing three decades of land use and land cover changes in Brazilian biomes with Landsat archive and earth engine.** Remote Sensing, v. 12, p. 2735, 2020.

STAHL, D.A. **Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny.** In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WATER, M.W. Manual of environmental microbiology. Washington: ASM Press, p 102-104, 1997.

STARK, N. M.; JORDAN, C. F. **Nutrient retention by the root mat of an Amazonian rain forest.** Ecology, v. 59, n. 3, p. 434–437, 1978.

STEHFEST, E.; BOUWMAN, L. **N₂O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions.** Nutrient Cycling in Agroecosystems, v. 74, p. 207–228, 2006.

STRICKLAND, M. S.; ROUSK, J. **Considering fungal:bacterial dominance in soils – Methods, controls, and ecosystem implications.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 9, p. 1385–1395, 2010.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. **Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in western Brazilian Amazon.** *Mycorrhiza*, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.

TOWNSEND, A.R.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C. C. **The biogeochemical heterogeneity of tropical forests.** *Trends Ecology & Evolution*, v. 234, p. 424–431, 2008.

TYUKAVINA, A. *et al.* **Types and rates of forest disturbance in Brazilian Legal Amazon, 2000–2013.** *Science Advances*, v. 3, n. 4, p. e1601047, 2017.

VASCO-PALACIOS, A. M. *et al.* **Ectomycorrhizal fungi diversity in a white sand forest in western Amazonia.** *Fungal Ecology*, v. 31, p. 9–18, 2018.

VIEIRA, R.F. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas.** Brasília, DF: Embrapa, 2017.

VILLARD, M.A.; METZGER, J.P. **Beyond the fragmentation debate: a conceptual model to predict when habitat configuration really matters.** *Journal of Applied Ecology*, v. 51, p. 309–318, 2014.

WANG, Q.; ZHONG, M.; WANG, S. **A meta-analysis on the response of microbial biomass, dissolved organic matter, respiration, and N mineralization in mineral soil to fire in forest ecosystems.** *Forest Ecology and Management*, v. 271, p. 91–97, 2012.

WANG, Y. *et al.* **Upturn in secondary forest clearing buffers primary forest loss in the brazilian Amazon.** *Nature Sustainability*, v. 3, n. 4, p. 290–295, 2020.

WHITTAKER, R.H. **Evolution and measurement of species diversity.** *Taxon*, v. 21, p. 213–251, 1972.

XIANG, X. *et al.* **Arbuscular mycorrhizal fungal communities show low resistance and high resilience to wildfire disturbance.** *Plant and Soil*, v. 397, n. 1, p. 347–356, 2015.

ZANELLA, A. *et al.* **A European morphofunctional classification of humus forms.** *Geoderma*, v. 164, p. 138–145, 2011.

ZHANG, D. *et al.* **Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors.** *Journal of Plant Ecology*, v. 1, n. 2, p. 85–93, 2008.

ZHANG, J. *et al.* **The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 76, p. 143–148, 2014.

ZHENG, H. *et al.* **The quality of the waste drives the differentiation of microbial communities in the litter horizon in an ecotone of the alpine tree line on the Tibetan Plateau.** *Scientific Reports*, v. 8, p. 10029, 2018.

CAPÍTULO 2 – ONDE ESTÁ A DIVERSIDADE? A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA AVALIAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO NA FLORESTA TROPICAL

RESUMO

As camadas orgânicas do solo, incluindo a serapilheira e seus produtos de decomposição, são fontes essenciais de energia e nutrientes para os microrganismos do solo, no entanto, eles têm recebido pouca importância em estudos de diversidade bacteriana realizados em florestas tropicais. Aqui, foi investigada uma floresta na Amazônia Oriental e uma pastagem adjacente como sistemas modelo para testar como a exclusão dessas camadas afeta as estimativas de diversidade bacteriana do solo. Sete camadas distintas foram identificadas no solo da floresta, incluindo as camadas L, F e H e suas subdivisões. Quatro camadas foram identificadas na pastagem, incluindo L e F, e os solos mineral e rizosférico. Foi realizada a extração do DNA e o sequenciamento do gene 16S rRNA por meio da plataforma Illumina. Os principais grupos de bactérias do ciclo do N - bactérias oxidantes de amônia (AOB) e arqueias (AOA), bactérias fixadoras de N₂ e desnitrificadores - foram quantificados por qPCR. Os resultados mostram um gradiente de comunidades bacterianas da serapilheira em direção à camada mineral em ambos os sistemas. Considerar as camadas orgânicas aumentou significativamente as estimativas de diversidade. O solo da pastagem apresentou as maiores diversidades bacterianas alfa e gama, enquanto o solo da floresta abrigou a maior diversidade bacteriana beta. Surpreendentemente, praticamente todos os grupos funcionais envolvidos no ciclo do N, exceto para AOB, foram mais abundantes na serapilheira fragmentada da pastagem do que no solo e na rizosfera. Esses grupos foram abundantes no horizonte H da floresta e, assim como na pastagem, AOB também foi abundante na serapilheira. Em conjunto, os resultados encontrados mostram que as camadas orgânicas da floresta e do piso das pastagens são reservatórios de significativa diversidade bacteriana e podem ser cruciais para a manutenção do ciclo do N nesses sistemas.

Palavras-chave: Amazônia, 16S rRNA, mudança do uso do solo, ciclo do N, genes funcionais

WHERE IS THE DIVERSITY? THE IMPORTANCE OF ORGANIC LAYERS FOR SOIL MICROBIAL DIVERSITY ASSESSMENT AND PRESERVATION IN THE TROPICAL RAINFOREST

ABSTRACT

Soil organic layers, including the litter and its decomposition products, are essential sources of energy and nutrients for soil microorganisms. Nevertheless, they have received little importance in bacterial diversity studies carried out in tropical forests. Here, an eastern Amazon Forest and an adjacent grassland were investigated as model systems to test how the exclusion of these layers affects estimates of soil bacterial diversity. Seven distinct layers were identified in the forest floor, including layers L, F and H and their subdivisions. Four layers were identified in the pasture, including L and F, and mineral and rhizospheric soils. DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing were performed using the Illumina platform. The main groups of N-cycle microorganisms - ammonia oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA), N₂-fixing and denitrifying bacteria - were quantified by qPCR. The results show a gradient of bacterial communities from litter towards the mineral layer in both systems. Considering organic layers significantly increased diversity estimates. The pasture soil had the greatest alpha and gamma bacterial diversities, while the forest soil had the greatest beta bacterial diversity. Surprisingly, all the functional groups involved in the N cycle, except for AOB, were more abundant in the fragmented litter of the pasture than in the soil and rhizosphere. These groups were abundant in the H horizon of the forest and, as in the pasture; AOB was also abundant in the litter. Together, the results show that the organic layers of the forest and the floor of the pastures are reservoirs of significant bacterial diversity and can be crucial for the maintenance of the N cycle in these systems.

Keywords: Amazon, 16S rRNA, land use change, N cycle, functional genes

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a abertura de novas áreas para agricultura e pecuária tem representado uma ameaça para a Amazônia, com uma taxa média de expansão anual de 4,6% entre 1987 e 2017 (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). Diante desse cenário, diversos estudos avaliaram os impactos do desmatamento e da mudança do uso do solo nas comunidades microbianas do solo e a ocorrência de mudanças em sua estrutura, composição e funcionalidade (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; MUELLER et al., 2014; PAULA et al., 2014; MENDES et al., 2015b; PEDRINHO et al., 2019).

Dentre os achados, foi observada a forte influência do pH do solo na estrutura e diversidade das comunidades bacterianas (JESUS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). Inesperadamente, as comunidades bacterianas no solo da floresta eram menos diversificadas do que as de áreas desmatadas para pastagem e agricultura (JESUS et al., 2009), o que foi confirmado por pesquisas seguintes (RODRIGUES et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). Rodrigues et al. (2013) observaram alta diversidade alfa associada a baixa diversidade beta em pastagens, indicando uma possível suscetibilidade a futuras perdas de diversidade. No entanto, Carvalho et al. (2016) encontraram maior diversidade bacteriana em pastagens e solos agrícolas em todas as dimensões (diversidades alfa, beta e gama). Esses autores atribuíram os resultados contrastantes em comparação a Rodrigues et al. (2013) às diferenças nos tipos de solo e floresta (CARVALHO et al., 2016). Assim, a questão de por que a diversidade bacteriana é maior na pastagem ainda precisa ser resolvida. A diversidade funcional, no entanto, mostrou ser reduzida (PAULA et al., 2014; KROEGER et al., 2018).

Apesar de suas contribuições indiscutíveis, com poucas exceções (RITTER et al., 2018; MOREIRA et al., 2021), esses estudos enfocaram as comunidades microbianas do solo mineral. A prática comum é remover a serapilheira e amostrar imediatamente abaixo da camada do solo, geralmente a porção mineral do solo, em profundidades que variam principalmente entre 5 e 20 cm (por exemplo, ver RODRIGUES et al., 2013; NAVARRETE et al., 2015, CARVALHO et al., 2016; KROEGER et al., 2018; MERLOTI et al., 2019; KHAN et al., 2020; KROEGER et al., 2020). Esta abordagem provavelmente foi emprestada de estudos de fertilidade do solo e provavelmente foi escolhida por uma questão de padronização. No entanto, ignora a maior complexidade do

solo florestal em comparação aos solos agrícolas. Recentemente, foi mostrado que esse foco pode levar a erros de interpretação e subestimar a diversidade microbiana (ROCHA et al., 2021).

Uma característica importante da floresta é o acúmulo de quantidades significativas de serapilheira, cujos produtos de decomposição fornecem uma fonte significativa de nutrientes (HERRERA et al., 1978; QUESADA et al., 2011). Não é incomum observar a camada radicular entrelaçada com a matéria orgânica em vários estágios de decomposição, formando um tapete radicular no topo do solo mineral. Esta característica foi relatada, pelo menos, desde a década de 1970 (HERRERA et al., 1978; STARK; JORDAN, 1978) e foi sugerido ser um importante mecanismo de conservação de nutrientes da floresta (JORDAN; HERRERA, 1981). Nesse ambiente, é possível verificar uma camada de folhas recentemente depositadas, (L), uma camada de material fragmentado, mas ainda reconhecível como serapilheira (F) e um horizonte orgânico (H) (PONGE et al., 2003). Essas camadas são ambientes heterogêneos capazes de abrigar comunidades microbianas com composição e metabolismo específicos (BALDRIAN et al., 2012; PRESCOTT et al., 2013; LÓPEZ-MONDEJAR et al., 2015).

Uma gama de informações sobre a microbiota do solo é perdida por não se levar em consideração essas camadas, e é possível que elas abriguem uma parte significativa da microbiota florestal ativa. Assim, sua exclusão pode levar a uma subestimação da diversidade microbiana relevante relacionada à ciclagem de nutrientes no solo da floresta (ROCHA et al., 2021). Semelhante ao solo, a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas nessas camadas mudam em resposta a fatores como diversidade das plantas e qualidade da serapilheira (CHAPMAN; NEWMAN, 2010; SANTONJA et al., 2017; PEI et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Além disso, essas camadas são diretamente impactadas pelo fogo (UHL et al., 1988; KAUFFMAN et al., 1995; DOS SANTOS; NELSON, 2013), possivelmente levando à perda de um importante componente das comunidades microbianas do solo.

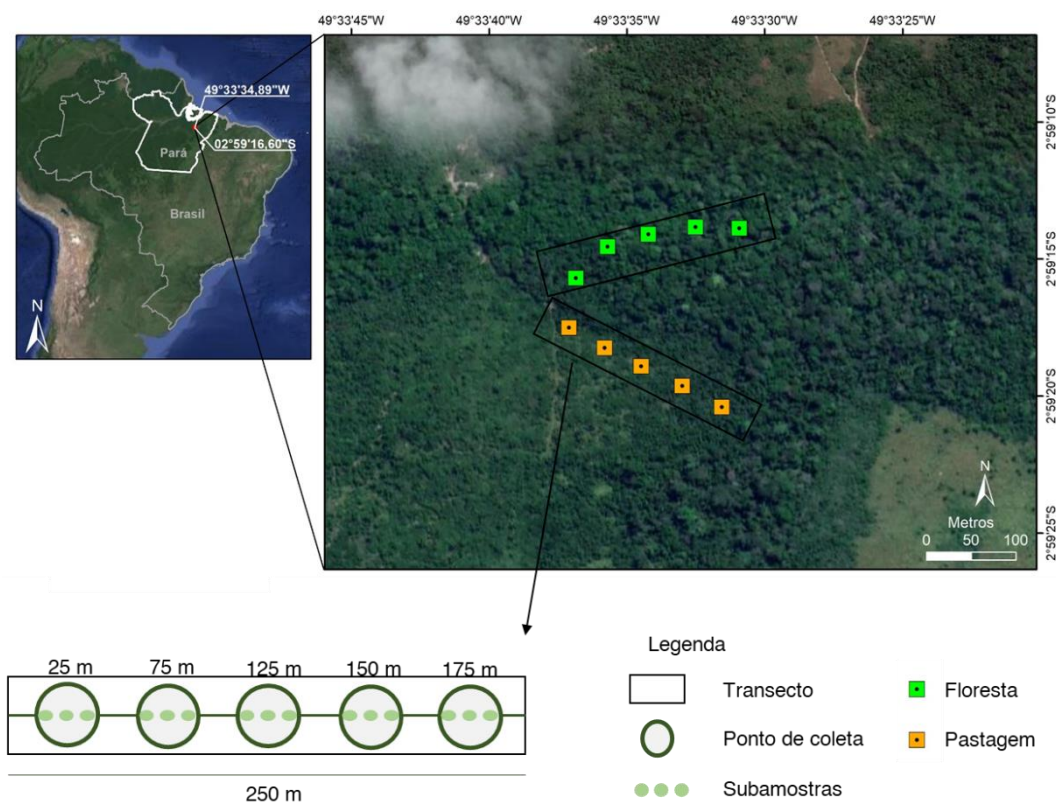
Portanto, é necessário entender como as comunidades bacterianas do solo da floresta tropical contribuem para a diversidade microbiana do solo e o quanto são afetadas pela mudança na cobertura do solo. Este estudo trabalhou sob as hipóteses de que (1) as camadas orgânicas do solo florestal contribuem para uma maior diversidade de procariotos neste ambiente em relação a uma área convertida em pastagem e (2) que essas camadas favorecem uma maior diversidade de microrganismos do ciclo do N.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e amostragem

O estudo foi realizado no Distrito de São Joaquim do Itaquara, município de Baião, no estado do Pará, Brasil (Figura 1). Foram coletados material de uma floresta primária e de uma pastagem adjacente no mês de dezembro de 2017. Os solos foram classificados como Espodosolo na área de floresta, transicionando-se a Latossolo na pastagem, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos. O clima da região é classificado como tropical de monções (Am – Classificação de Köppen), com temperatura média de 26.3°C e pluviosidade média anual de 2.202 mm.

Figura 1 – Área de coleta e esquema representativo de amostragem.

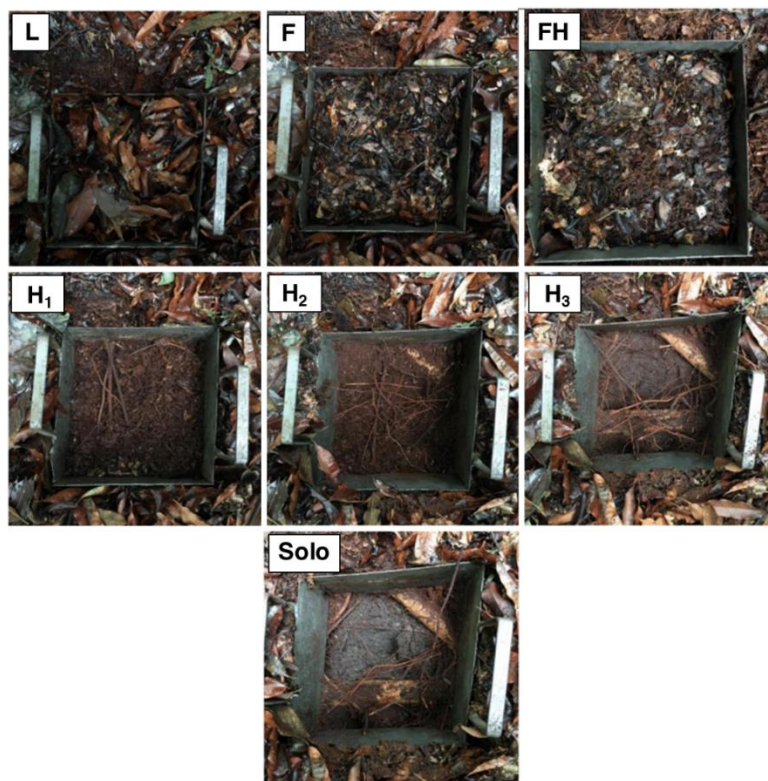


Fonte: Google Earth (julho de 2018).

Para a coleta, foi delimitado um transecto de 250 m em cada área, com cinco pontos de coleta igualmente espaçados (50 m) (Figura 1). A distância entre o último ponto de coleta da floresta e o primeiro ponto da pastagem foi de 100 m. Em cada ponto, com auxílio de gabarito metálico de 25 x 25 cm, foram coletadas amostras compostas, formadas por três subamostras, de camadas orgânicas e, também, do solo mineral. Estas

foram definidas como camadas L, F e H, subdivididas em subcamadas conforme sua diferenciação morfológica, além dos 10 primeiros cm da porção mineral do solo (Figura 2; Figura 3). A forma de distinção e coleta do material foi baseada em trabalhos de classificação de formas de húmus e no exame visual do material amostrado (TOUTAIN, 1981; PONGE et al., 2003). Na Floresta, foram identificadas e coletadas sete camadas distintas, assim denominadas: L (“litter”); F (“fragmented litter”); uma transição entre F e o horizonte H, aqui denominada FH; H₁, H₂, H₃, que são subdivisões do horizonte H e cujas características são destacadas adiante e o solo mineral. Já na pastagem, foram identificadas e coletadas as camadas L e F, a porção mineral do solo e o solo rizosférico de plantas de *Urochloa* sp. As demais camadas identificadas na floresta não estavam presentes na pastagem. Daqui em diante, utilizaremos os termos “piso da floresta” e “piso da pastagem” para designar o conjunto de todas as camadas (orgânicas e mineral) desses ambientes.

Figura 2 – Coleta das camadas orgânicas e solo mineral da floresta com auxílio de gabarito metálico.



Fonte: Ederson C. Jesus (2018).

Figura 3 – Coleta das camadas orgânicas e solo mineral da pastagem com auxílio de gabarito metálico.



Fonte: Ederson C. Jesus (2018).

A camada L é constituída por folhas da serapilheira recém caídas e não fragmentadas. A F se constitui de folhas fragmentadas e pequenas quantidades de material orgânico fino. A FH é caracterizada por uma abundância de raízes misturada às folhas fragmentadas e contendo uma maior quantidade de matéria orgânica fragmentada com diâmetro menor que 2 mm. A camada H foi subdividida em três subcamadas conforme sua diferenciação morfológica: a primeira, H₁, se caracteriza pela abundância de material orgânico fragmentado e fino, com uma alta abundância de raízes de árvores e outras plantas da floresta; a segunda, H₂, possui visivelmente uma menor abundância de raízes; e a terceira, H₃, se constitui numa transição entre a camada orgânica e o solo mineral, com uma mistura abundante de matéria orgânica e areia. Por fim, a porção mineral se caracterizou por uma textura prioritariamente arenosa.

Após a coleta, as amostras foram peneiradas em malha de 2 mm (exceto L e F das duas áreas) e, posteriormente, armazenadas a -80°C. Dessa forma, foram coletadas cinco repetições de oito camadas (incluindo o solo mineral) advindas da floresta e quatro camadas da pastagem (incluindo solo mineral e rizosférico), totalizando 60 amostras.

2.2 Análise química das camadas orgânicas e solo mineral

As análises foram realizadas pelo Polo INOVASOLOS da Embrapa Solos, com base nas recomendações do Manual de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997).

As amostras das camadas orgânicas (L, F, FH, FHg, H1 e H2 da floresta e L e F da pastagem) submetidas inicialmente a um bloco digestor (exceto para análise de potássio, que se deu por meio de digestão em micro-ondas). O nitrogênio foi quantificado

por destilador Kjeldahl e o potássio por fotômetro de chama. Os demais elementos (P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn) foram analisados por espectrometria de absorção atômica.

Para as camadas organominerais (H₃ da floresta e rizosfera da pastagem) e minerais (solos de floresta e pastagem) foram analisados: carbono orgânico pelo método do dicromato de potássio em meio sulfúrico e titulação; nitrogênio total pelo método Kjeldahl. Os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn foram extraídos por Mehlich-1 e determinadas por espectrometria de absorção atômica. Os cátions Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram extraídos por meio da solução de KCl 1 mol L⁻¹. Para H + Al foi utilizada a solução de acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0. A extração de Na⁺, K⁺ e P foi realizada com solução de H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹ + HCl 0,05 mol L⁻¹. Os teores de Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinados por espectroscopia de absorção atômica; K⁺ e Na⁺ por fotometria de chama; P por espectrofotômetro UV-Vis; Al³⁺ e H + Al por titulometria. As bases trocáveis (ES) foram calculadas pela soma de Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺. A capacidade de troca catiônica (CEC) foi calculada pela soma de BS e da acidez potencial (H + Al). A saturação por bases (V%) foi calculada como a razão entre cátions trocáveis e CEC, multiplicada por 100.

A análise de abundância natural dos isótopos ¹³C e ¹⁵N foi realizada para todas as amostras pelo Laboratório John Day da Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ, Brasil. As amostras foram secas a 60°C, homogêneas e moídas em pó fino em moinho de bola. Após, em triplicata, as amostras foram pesadas em cápsulas de estanho. A quantidade analisada baseou-se nos valores de N total das análises anteriores, dividindo o valor 4 (40 μ de N total na amostra, que é a escala máxima de leitura do espectrômetro de massa utilizado - Finnigan MAT, Bremen, Germany) pelo teor de N total (%).

2.3 Extração de DNA

As amostras L, F e FH, que continham fragmentos de folha e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido. As amostras das demais camadas foram utilizadas diretamente para extração de DNA. A extração de DNA foi realizada com o kit *DNeasy Power Soil* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 0,25 g de amostras maceradas e 0,50 g das demais. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) observando sua pureza pela relação A260/280 e sua integridade por eletroforese em gel de agarose a 1% (100 V por 30 min), corado em brometo de etídio, com visualização das bandas de DNA em fotodocumentador.

2.4 Sequenciamento e análises de bioinformática

O sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA de Bacteria foi realizado pelo *Institute for Genomics and Systems Biology Next Generation Sequencing* (IGSB-NGS) do Laboratório Nacional de Argonne (Chicago, EUA), seguindo os protocolos de amplificação do *Earth Microbiome Project* (THOMPSON ET AL., 2017). Foi utilizado o par de primer 515F e 806R (CAPORASO et al., 2011) que amplifica a região V4 do 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado pela plataforma Illumina MiSeq (2 × 250 pb paired-end). As sequências obtidas foram analisadas por meio da pipeline DADA2 (1.8) (CALLAHAN et al., 2016) incorporada ao software R (R CORE TEAM, 2021). As sequências foram desmultiplexadas, filtradas quanto à sua qualidade (Q score menor que 20, com corte em 250 bp nas sequências Forward e 225 bp nas reverse), unidas e classificadas utilizando o banco de dados SILVA v.138 (QUAST et al., 2013). A tabela ASV gerada foi convertida em objeto *phyloseq*, usando o pacote *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013) para as análises posteriores.

2.5 PCR em tempo real de genes do ciclo do nitrogênio

A abundância de Bacteria, Archaea e dos genes funcionais do ciclo do nitrogênio foi determinada por meio da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) em número de cópias de gene por grama de solo. Foram avaliados os genes: 16S rRNA de Bacteria e Archaea; nitrogenase (*nifH*) para fixação de nitrogênio; amônio monooxigenase (*amoA*) de Bacteria e Archaea para nitrificação (NH_3^+ para NH_2OH); nitrito redutase (*nirS*; NO_2^- para NO) e óxido nitroso redutase (*nosZ*; N_2O para N_2) para desnitrificação. As análises foram realizadas utilizando o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR com placas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram construídas curvas padrão por meio de diluições seriadas de genes de microrganismos conhecidos por conter as enzimas do ciclo do N, previamente amplificados por PCR. Para uma melhor eficiência das curvas padrões, todos os genes utilizados nas curvas foram purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. Os microrganismos usados como padrão, *primers* e condições de amplificação encontram-se no Apêndice A. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata em um volume final de 10 μL de reação, composta por 5.0 μL de SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), de 0.67 a 1.0 μL de cada primer (ver Apêndice A), 0.5 μL de *bovine serum albumin* (BSA, 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 1.0

μL de DNA diluído 50 vezes e água para PCR suficiente para completar o volume final. Para todos os ensaios, a eficiência da amplificação variou entre 96% e 106% e os valores de R^2 foram de 0,98–0,99.

2.6 Análise de dados e estatística

As análises foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2021). Uma filtragem foi aplicada para remoção de sequências de baixa prevalência e sequências de eucariotos, cloroplastos e mitocôndrias. O comprimento do gradiente de distribuição das espécies foi verificado pela análise de correspondência destendenciada (DCA). O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) foi utilizado para visualizar as dissimilaridades na estrutura da comunidade bacteriana com base na matriz de distância de Bray-Curtis (BRAY & CURTIS, 1957), no pacote *phyloseq*. A análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001) foi aplicada para observar diferenças significativas nas estruturas das comunidades, também com base na matriz de distância de Bray-Curtis no pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2020). Para avaliar a composição de filo das comunidades entre as camadas de cada sistema de uso da terra, os dados de abundância relativa foram verificados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade da variância (Bartlett) no pacote *easyanova* (ARNHOLD, 2019). Os dados de abundância relativa seguiram o pressuposto de testes não-paramétricos e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância com o método de ajuste FDR (*False Discovery Rate*), pelo pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2020).

Para medir os índices de diversidade alfa, os dados foram rarefeitos para o menor número de leituras obtido (10402 leituras). Uma amostra contendo 7007 leituras foi removida da análise para evitar a redução do tamanho das demais amostras para um número tão baixo de leituras. Assim, as medidas de diversidade alfa (Chao1 e Shannon) foram calculadas para cada camada orgânica e solo mineral e para os sistemas de uso da terra como um todo pelo pacote *phyloseq*. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância com o método de ajuste FDR (*False Discovery Rate*), pelo pacote *agricolae*.

A análise de partição de diversidade foi realizada utilizando números de Hill, através do pacote *Entropart* (MARCON; HÉRAULT, 2015). Os números de Hill geram números efetivos de espécies igualmente frequentes para cada valor de ordem “q” em uma estrutura unificada, tornando possível a interpretação e comparação direta (CHAO

et al., 2014). Foram utilizadas as ordens $q = 0$ (atribui peso igual a todas as espécies, inclusive às raras, representando a riqueza de espécies), $q = 1$ (exponencial da entropia de Shannon, que atribui às espécies peso proporcional a sua frequência, representando o número de espécies comuns da comunidade) e $q = 2$ (inverso de Simpson, representando espécies dominantes) (JOST, 2006). O particionamento de diversidade foi aplicado em todas as camadas tanto da floresta, quanto da pastagem, assim como para o piso da floresta e piso da pastagem.

As abundâncias dos genes funcionais do ciclo do N, obtidos através da qPCR, foram analisados no programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystem, USA) quanto a sua especificidade e eficiência. Os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância com o método de ajuste FDR no pacote *agricolae*.

3 RESULTADOS

3.1 Propriedades químicas dos solos

Os nutrientes foram analisados com diferentes metodologias nas camadas de natureza vegetal (L a H₂) e mineral (H₃, solo mineral e solo rizosférico). Portanto, deve-se tomar cuidado nas comparações das concentrações entre as camadas orgânicas e minerais.

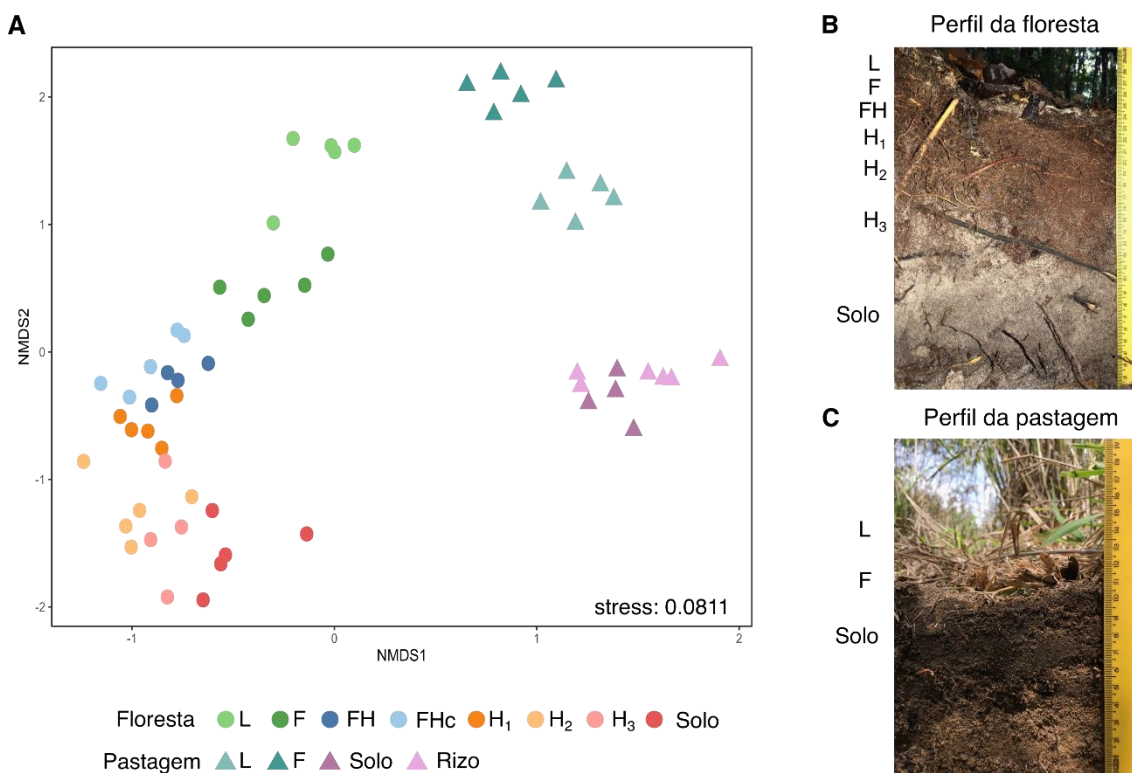
Na floresta, a relação C:N diminuiu em profundidade, da camada L para a camada H₂, o que equivale a dizer que ela foi menor em camadas de estágio de decomposição mais avançado (Apêndice B). As concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn diminuiriam no mesmo sentido, enquanto a concentração de Fe aumentou. O P teve maior concentração na liteira e menor no horizonte orgânico (camadas H₁ e H₂). Na pastagem, as concentrações de Ca, Mg, ¹³C e a relação C:N foram maiores na camada L se comparadas à camada F.

No que diz respeito aos solos (Apêndice C), ambos podem ser considerados ácidos, porém o pH foi significativamente menor no solo da floresta, com média de 4,3 contra 5,68 e 5,76 nos solos mineral e rizosférico da pastagem. O solo da pastagem apresentou maiores concentrações de Ca, Fe, Mn e Zn. Na floresta, por sua vez, foram observadas maiores concentrações de Al, ¹³C e C orgânico.

3.2 Estrutura da comunidade microbiana

Com base na análise de NMDS (stress = 0.0811 – Figura 4), observou-se a separação das comunidades de floresta e pastagem em dois grupos distintos. Em ambos os usos da terra, houve um gradiente de distribuição e substituição de espécies da camada L, a mais superior, para o solo mineral, indicando claramente a existência de um *ecoline* ao longo do perfil vertical do *episolum*. Esse gradiente foi longo em ambos os sistemas, com 6.08 e 4.68 desvios padrão na floresta e na pastagem, respectivamente, mostrando que há uma substituição de espécies ao longo do gradiente e uma alta diversidade beta entre as camadas (Apêndice D). A PERMANOVA ($F = 6.43$, $P < 0.001$) permitiu a identificação de comunidades significativamente distintas dentro de cada sistema. Na floresta, foram identificadas seis diferentes estruturas de comunidade associadas às camadas L, F, FH/FHc, FH/H₁, H₂/H₃ e H₃/solo mineral. Padrão similar foi observado na pastagem, porém com três estruturas distintas de comunidade associadas às camadas L, F e o solo e rizosfera. Cabe destacar que as camadas L da floresta e da pastagem foram aquelas que apresentaram a menor dissimilaridade entre as áreas.

Figura 4 – Análise de escalonamento multidimensional não-métrica (NMDS) das comunidades de bactérias das camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem (A); Perfil do solo florestal (B) e da pastagem (C).



Fonte: Ederson C. Jesus (2018).

3.3 Composição da comunidade microbiana

A composição da comunidade microbiana variou de acordo com as camadas e alguns gradientes foram observados para os principais filos. Na floresta, as abundâncias dos filos Proteobacteria, Bacteroidota e Firmicutes decresceram em profundidade, onde os dois últimos não foram observados a partir das camadas H₂ e FH, respectivamente, considerando abundância maior que 1% (Figura 5A; Apêndices E-H). Já os filos Acidobacteriota, Actinobacteriota, Planctomycetota e Verrucomicrobiota apresentaram abundâncias crescentes em profundidade, com destaque no horizonte H.

Na pastagem, os gradientes não foram tão nítidos devido ao menor número de camadas, mas, no geral, Proteobacteria, Actinobacteriota e Bacteroidota foram mais abundantes nas camadas orgânicas (Figura 5A). Para Acidobacteriota não houve diferença da abundância ao longo das camadas. Firmicutes, Verrucomicrobiota e Planctomycetota destacaram-se no solo mineral e na rizosfera.

No nível de gênero, 45% das sequências da floresta e 82% da pastagem representaram gêneros com abundância menor do que 4%, indicando a grande diversidade

microbiana nesse nível, principalmente na pastagem (Figura 5B). No geral, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, representando 20% das sequências da floresta, foi o gênero mais abundante nesse ambiente, assim como *Sphingomonas* (9%) na pastagem. Entretanto, analisando as camadas individualmente, em algumas, houve a dominância de outros gêneros. Na floresta, destacou-se na camada L o gênero *Acinetobacter* (11%). *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* dominou as camadas F a H₁ (F - 24%; FH - 29%; FHc - 32%; H₁ - 29%) e a partir de H₂, *Acidothermus* prevaleceu (H₂ - 20%; H₃ - 30%; mineral soil - 20%). Na pastagem, *Sphingomonas* dominou a camada F e o solo mineral com abundância de 7% em cada. Na camada L, *Methylobacterium-Methylorubrum* dominou com 13% e na rizosfera, destacou-se *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* com 10% de abundância.

3.4 Diversidade da comunidade microbiana

A riqueza de espécies procarióticas na Floresta (Figura 6A) diferiu significativamente apenas entre as camadas H₂ e FHc ($H = 14.66$, $p = 0.041$). Na pastagem, a camada L apresentou a menor riqueza e as demais camadas não diferiram entre si ($H = 8.17$, $p = 0.042$) (Figura 6B). Quando consideradas as comunidades de todas as camadas em conjunto, a riqueza geral do piso da pastagem foi superior à do piso da floresta ($H = 29.90$, $p = 4.5e-08$) (Figura 6C).

Em relação à diversidade calculada pelo índice de Shannon, na floresta, destacou-se a camada H₂, única a diferenciar-se das camadas H₃ e solo mineral ($H = 19.91$, $p = 0.0058$) (Figura 6D). Na pastagem, a camada L apresentou a maior diversidade, porém não diferiu do solo mineral e da rizosfera ($H = 9.69$; $p = 0.0214$) (Figura 3E). Assim como para riqueza, a diversidade de Shannon do pasture floor também foi superior à do forest floor ($H = 28.25$, $p = 1.1e-07$) (Figura 6F).

Figura 5 – Abundância relativa de (A) filos e (B) gêneros bacterianos em camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H1, húmus com

de raízes finas; H2, húmus; H3, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

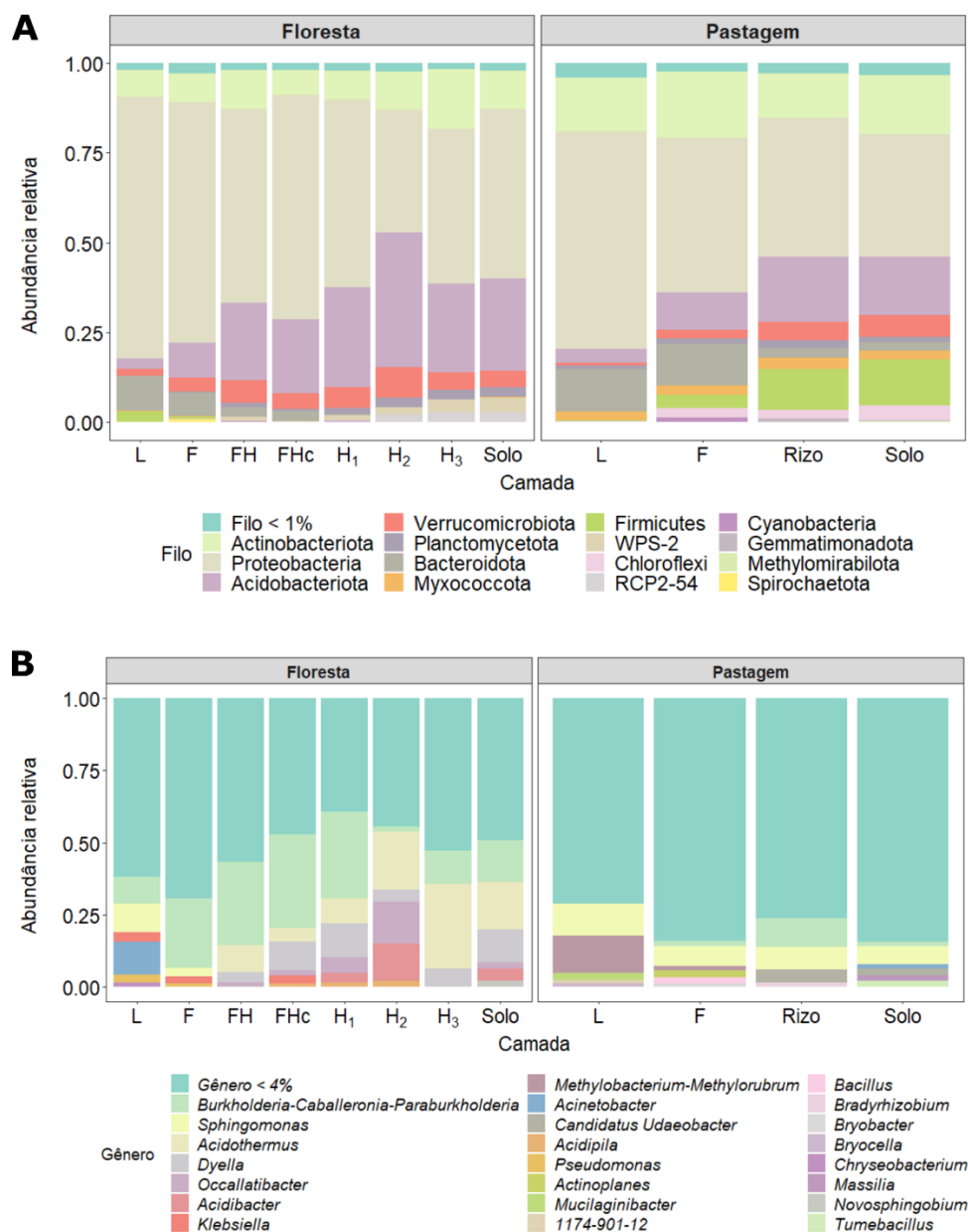
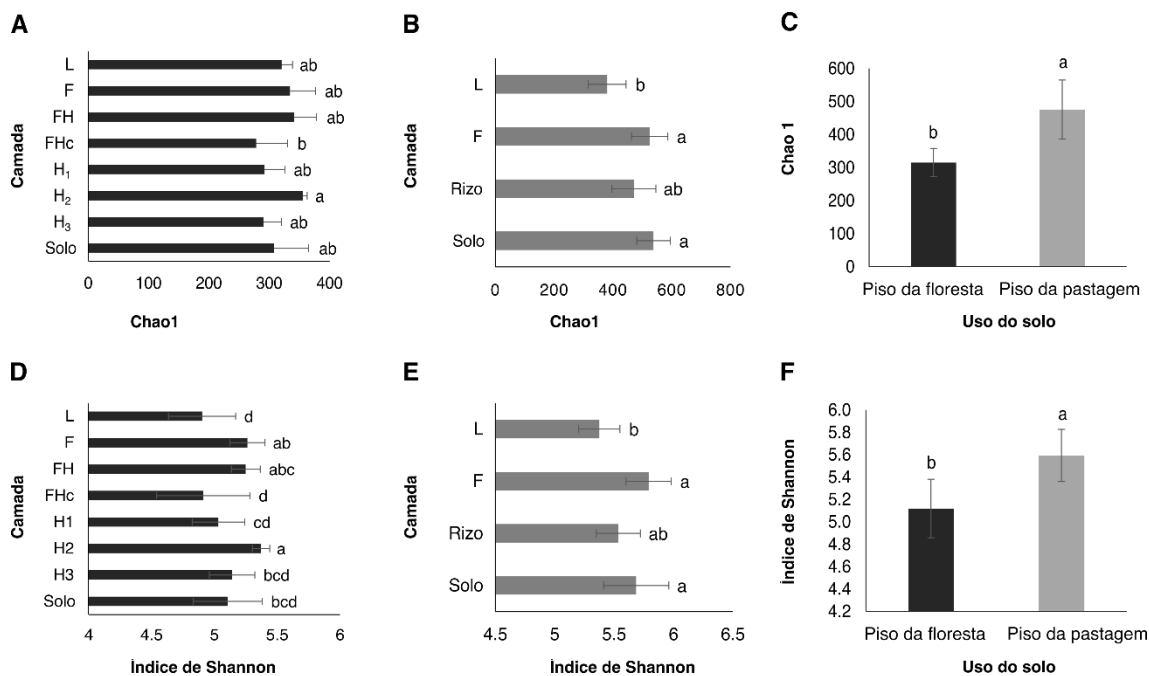


Figura 6 – Riqueza de Chao1 e índice de Shannon das camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral (A e D, respectivamente) da floresta, (B, E) da pastagem e (C, F) total dos sistemas de uso da terra. Barras de erro indicam desvio padrão de cinco repetições independentes. Letras diferentes referem-se a diferença estatística entre as camadas orgânicas e solo mineral

ou sistema de uso da terra com base no teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H1, húmus com de raízes finas; H2, húmus; H3, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

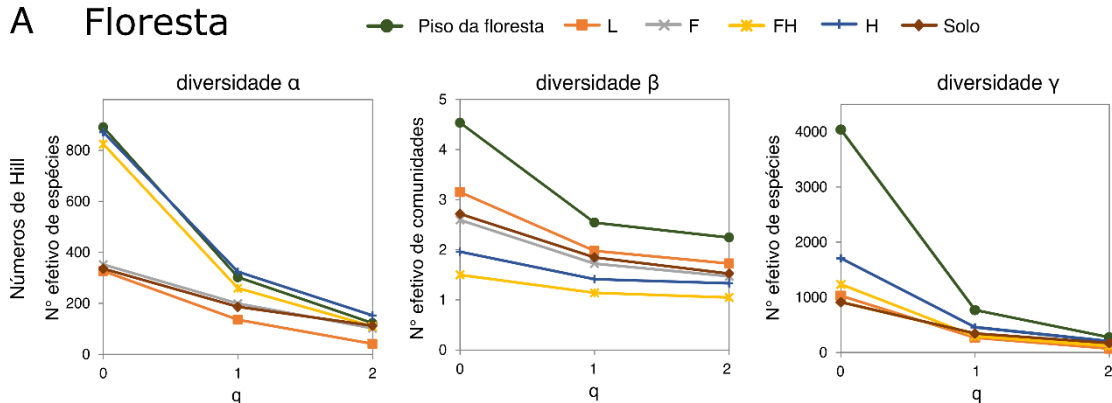


A análise de partição de diversidade mostrou que para alfa, beta e diversidade gama da floresta, a riqueza de ASVs ($q = 0$) e exponencial de Shannon ($q = 1$) foram superiores para o piso da floresta em relação as demais camadas (Figura 7A). Na pastagem, alfa e diversidade gama do piso da pastagem também foram superiores (Figura 7B), porém a diversidade beta foi inferior as demais camadas. Comparando os dois sistemas de uso da terra (Figura 7C), a alfa e diversidade gama do piso da pastagem foi superior ao piso da floresta e solo mineral da floresta para riqueza de ASVs ($q = 0$) e exponencial de Shannon ($q = 1$). Entretanto, para a diversidade beta, foi possível observar superioridade desses parâmetros referentes ao piso da floresta em relação ao piso da pastagem. A dominância de Simpson ($q = 2$), representando o número efetivo de espécies ou comunidades dominantes, foi similar para a maioria das comparações, exceto para a diversidade beta da floresta e pastagem, com destaque para o piso da floresta e piso da pastagem.

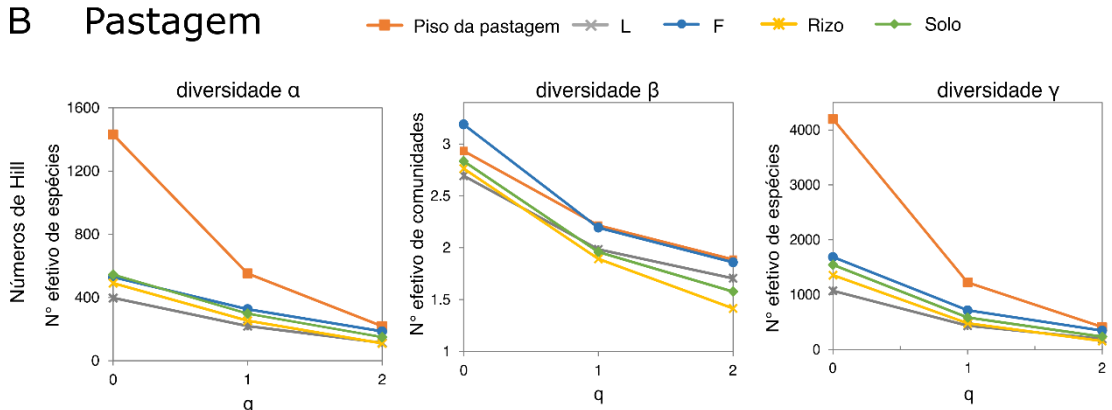
Figura 7 – Análise de partição de diversidade avaliando diversidades alfa, beta e gama para floresta, pastagem e comparando os ambientes, onde as ordens $q = 0$ representa a riqueza de ASV; $q = 1$, exponencial da entropia de Shannon para

ASVs igualmente ponderados; $q = 2$, inverso do índice de Simpson para taxas dominantes.

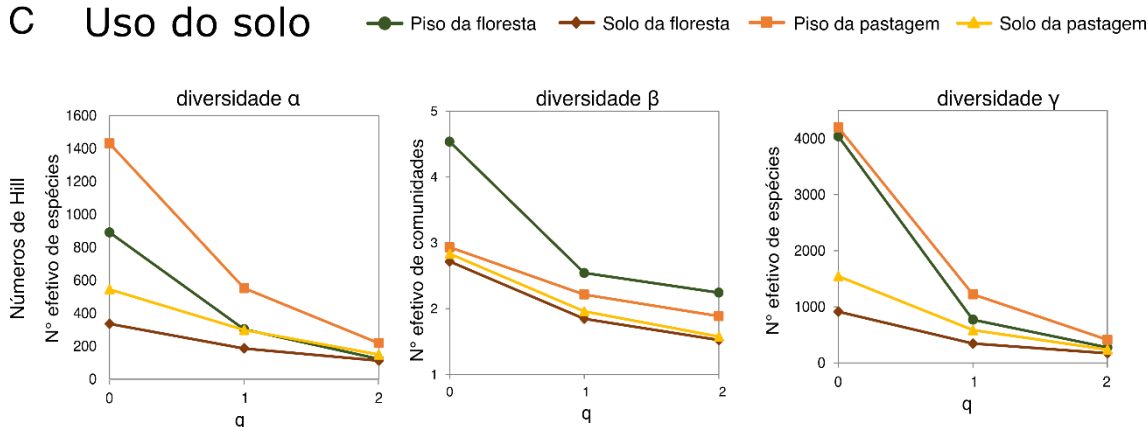
A Floresta



B Pastagem



C Uso do solo



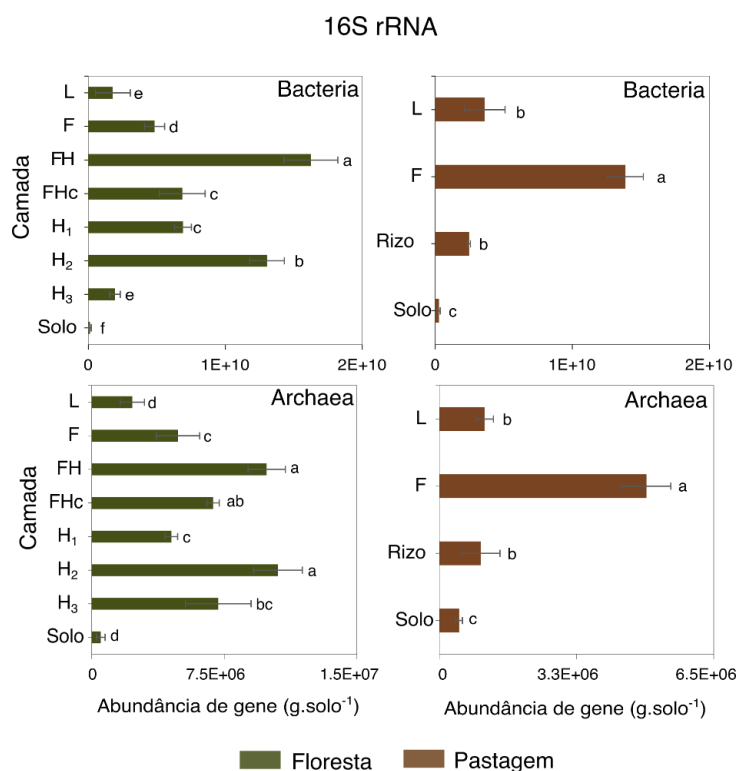
3.5 Abundância dos genes funcionais do ciclo do nitrogênio

As abundâncias de Bacteria e Archaea, bem como a dos principais grupos envolvidos no ciclo do N foram avaliadas por meio da quantificação dos genes 16S rRNA de Bacteria e Archaea e dos genes funcionais da fixação de nitrogênio (*nifH*), oxidação da amônia (*amoA* de Bacteria e Archaea) e desnitrificação (*nirS* e *nosZ*).

Na floresta, Bacteria foram mais abundantes nas camadas orgânicas, em especial em FH e H₂ ($H = 36.65$, $p = 5.4e-06$) (Figura 8). Na pastagem, a camada F deteve a maior

abundância de Bacteria ($H = 16.35$, $p = 0.00096$), em nível comparável ao das camadas FH e H₂ da floresta. Já Archaea, de modo geral, foi mais abundante na floresta, se comparado à pastagem (Figura 8). Assim como Bacteria, este domínio foi mais abundante nas camadas orgânicas, especialmente FH e H₂ da floresta ($H = 31.74$, $p = 4.5e-05$) e na camada F da pastagem ($H = 16.35$, $p = 0.00096$). Cabe destacar que, para ambos os domínios, houve uma queda na abundância na camada H₁, com um aumento na camada H₂. As abundâncias de organismos de ambos os domínios foram significativamente menores no solo mineral de ambos os sistemas.

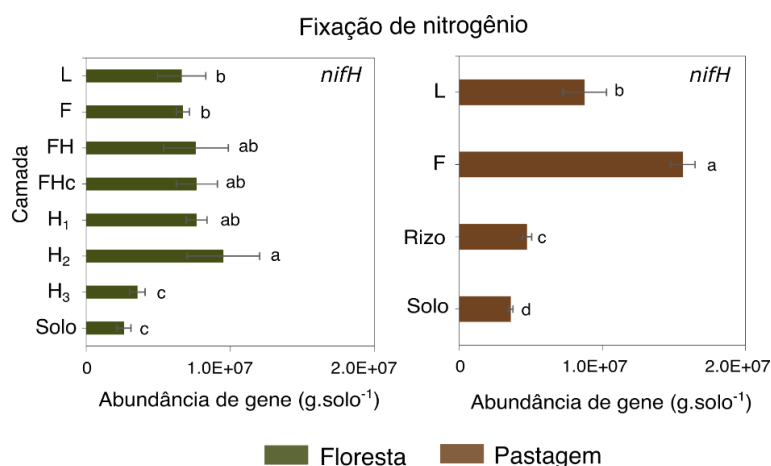
Figura 8 – Abundância do gene 16S rRNA de (A) Bacteria e (B) Archaea em camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem. Barras de erro indicam desvio padrão de cinco repetições independentes. Letras diferentes referem-se a diferença estatística entre as camadas orgânicas e solo mineral de um mesmo sistema de uso da terra com base no teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com de raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Na floresta, a abundância do gene *nifH* foi maior nas camadas orgânicas, em especial na camada H₂ ($H = 26.33$, $p = 0.00044$) (Figura 9). A abundância desse gene foi

significativamente menor na camada de transição H₃ e no solo. As camadas orgânicas da pastagem também apresentaram maior abundância de *nifH* ($H = 17.91$, $p = 0.00046$), com destaque para a camada F. Sua abundância foi menor na camada L, solo rizosférico e, especialmente, no bulk soil (Figura 9).

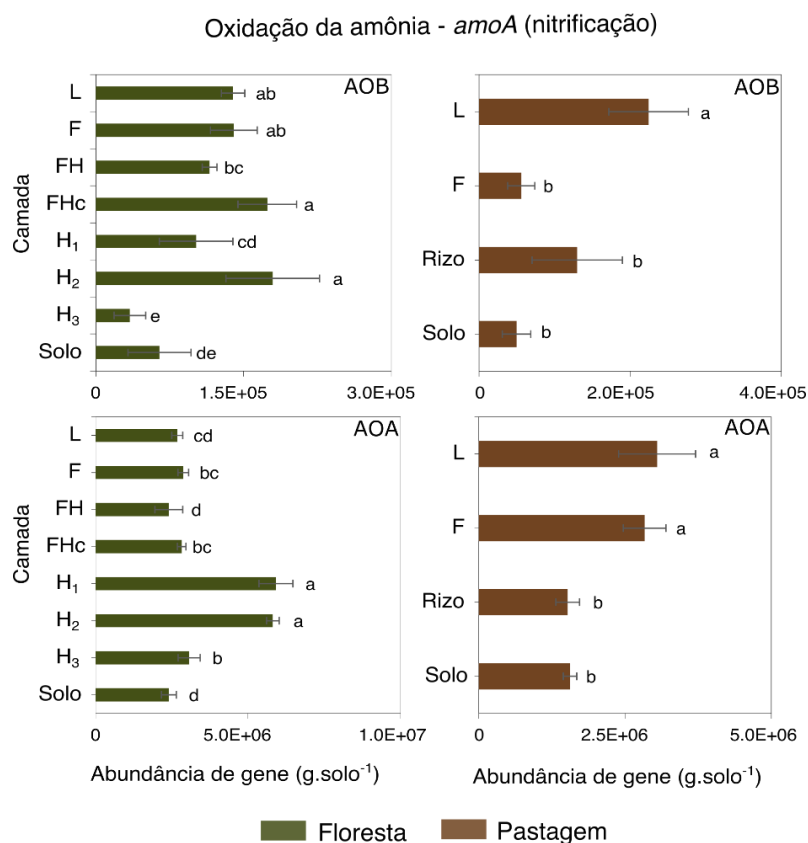
Figura 9 – Abundância do gene funcional *nifH* (fixação biológica de N) nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e pastagem. Barras de erro indicam desvio padrão de cinco repetições independentes. Letras diferentes referem-se à diferença estatística entre as camadas orgânicas e solo mineral de um mesmo sistema de uso da terra com base no teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com de raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Archaeas oxidantes de amônia (AOA) foram mais abundantes nas camadas H₁ e H₂ da floresta e menos no solo mineral e nas camadas de folhas L e F ($H = 29.77$, $p = 0.00010$) (Figura 10). Bactérias oxidantes de amônia (AOB), além de se destacarem nas camadas FHc e H₂ da floresta, estavam presentes em abundância considerável nas camadas de folha L e F ($H = 29.38$, $p = 0.00012$) (Figura 10). Na pastagem, esses grupos também foram abundantes nas camadas orgânicas. AOA estava abundantemente presente nas camadas L e F ($H = 14.46$, $p = 0.0023$), enquanto AOB destacou-se apenas na camada L ($H = 12.60$, $p = 0.0056$).

Figura 10 – Abundância do gene funcional *amoA* (nitrificação) de bactérias oxidadores de amônia (AOB) e arqueias oxidadoras de amônia (AOA) nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e da pastagem. Barras de erro indicam

desvio padrão de cinco repetições independentes. Letras diferentes referem-se à diferença estatística entre as camadas orgânicas e solo mineral de um mesmo sistema de uso da terra com base no teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H1, húmus com de raízes finas; H2, húmus; H3, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

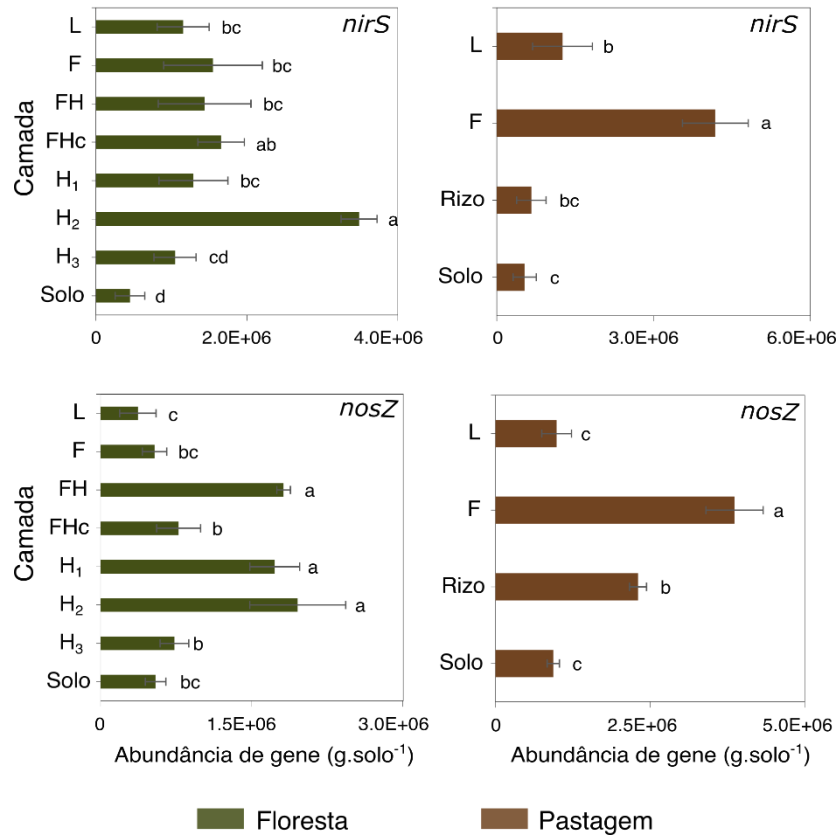


O gene de desnitrificação *nirS* apresentou elevada abundância na camada H₂ da floresta, tornando sua presença bastante discrepante das demais camadas ($H = 25.05$, $p = 0.0007$) (Figura 11). Na pastagem, *nirS* destacou-se na camada F que foi significativamente superior à L e aos solos mineral e rizosférico ($H = 13.67$, $p = 0.0034$). O gene *nosZ* foi mais abundante nas camadas FH, H₁ e H₂ da floresta e seus menores valores estavam associados ao solo mineral e às camadas orgânicas L e F ($H = 28.85$, $p = 0.0001$) (Figura 11). Na pastagem, *nosZ* destacou-se na camada F e foi menos abundante no solo mineral e na camada L ($H = 16.26$, $p = 0.0010$).

Figura 11 – Abundância dos genes funcionais *nirS* e *nosZ* (desnitrificação) nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e da pastagem. Barras de erro indicam desvio padrão de cinco repetições independentes. Letras diferentes referem-

se à diferença estatística entre as camadas orgânicas e solo mineral de um mesmo sistema de uso da terra com base no teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H1, húmus com de raízes finas; H2, húmus; H3, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico. Solo, solo mineral.

Desnitrificação



4 DISCUSSÃO

A diversidade de microrganismos em solos tropicais tem sido estudada com foco nos horizontes minerais, desconsiderando a serapilheira e produtos de sua transformação, com raras exceções (RITTER et al., 2018; ROCHA et al., 2021). Aqui, foi proposta uma abordagem alternativa holística para estudar a diversidade microbiana no solo da floresta tropical. Estudos semelhantes já foram realizados para diversidade microbiana em solos temperados (TRAP et al., 2011) e fauna do solo com enfoque nas formas de húmus (SALMON et al., 2005; IZADI et al., 2017; SALMON, 2018), que representam o conjunto de camadas orgânicas e organominerais do solo (TOUTAIN, 1981; PONGE et al., 2003). Este estudo não aprofundou-se no conceito de forma de húmus, mas utilizou sua abordagem de classificação de diferentes extratos orgânicos do solo de acordo com o grau de decomposição do material (ZANELLA et al., 2011). Devido ao equívoco de que em ambientes tropicais a matéria orgânica não se acumula sobre o solo em razão das altas temperaturas e umidade, pouca atenção foi dada à microbiota dos horizontes orgânicos. No entanto, nos raros trabalhos de classificação de formas de húmus no Brasil, já foram descritas formas de húmus do tipo MODER, caracterizado por elevado acúmulo de matéria orgânica sobre os horizontes minerais (GARAY et al., 1995; KINDEL; GARAY, 2002). Esse acúmulo pode ser ocasionado por um conjunto de fatores e não apenas pela temperatura e umidade, como tipo de solo, posição no relevo, vegetação, entre outros (PONGE, 2003). Diante da heterogeneidade da floresta amazônica e das lacunas acerca da microbiota do piso da floresta, foi investigada a diversidade microbiana associada às camadas orgânicas de uma área de floresta, mas também de uma pastagem na Amazônia Oriental.

Observou-se a existência de uma grande diversidade microbiana nas camadas orgânicas do piso da floresta, com destaque para o horizonte H, especificamente a camada H₂. O substrato dessa região pode ter sido um fator importante para o destaque em diversidade. O horizonte H consiste, em grande parte, por material umedecido com pouca ou nenhuma estrutura vegetal visível (exceto raízes finas) devido à ação da fauna edáfica e fungos, que transformam a serapilheira e disponibilizam nutrientes para plantas e microrganismos. A elevada presença de raízes finas nesse horizonte já foi relatada como um mecanismo de conservação de nutrientes da floresta amazônica frente aos solos de baixa fertilidade (HERRERA et al., 1978) e ressalta a sua importância para a nutrição das plantas da floresta. Essas raízes conseqüentemente aumentam a interação planta-

microrganismos, permitindo a comparação do substrato de H₂ com um solo rizosférico. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Mundra et al. (2021) em ambiente temperado que, além da diversidade procariótica, também verificaram elevada biomassa fúngica acima do solo mineral. Entretanto, nesse estudo as camadas orgânicas não foram estratificadas.

A estratificação permitiu observar um claro gradiente de estrutura da comunidade microbiana ao longo do perfil da floresta, que parece acompanhar os estágios de decomposição da matéria orgânica. A vegetação é capaz de afetar a comunidade microbiana do solo através da qualidade da serapilheira (COOLS et al., 2014; URBANOVÁ et al., 2015; WAN et al., 2015; GROSSO et al., 2016; YAN et al., 2018; ZHENG et al., 2018; NIE et al., 2021). À medida que esse material é decomposto, a qualidade do substrato é modificada, alterando os parâmetros que conduzem à diferenciação das comunidades microbianas como as razões C:N e C:P, teor de umidade, pH e proporções de celulose, hemicelulose e lignina, por exemplo (PAPA et al., 2013; BROCKETT et al., 2012; ZHENG et al., 2018). Assim, essas variações atuam como um filtro ecológico, provavelmente resultando em uma compartimentação funcional das comunidades microbianas.

A mesma abordagem foi utilizada para estudar uma pastagem, onde observou-se elevada diversidade bacteriana na camada F da serapilheira. Essa camada era visivelmente mais úmida em relação à camada anterior (camada L), o que pode ter sido um dos fatores que favoreceram a atividade microbiana (BROCKETT et al. 2012). Surpreendentemente, a riqueza e a diversidade alfa da camada F foram iguais às do solo rizosférico, região considerada como um hotspot de diversidade e atividade microbianas (HINSINGER et al., 2009; KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015) devido à liberação de exsudados radiculares, ricos em carbono orgânico, que beneficiam o crescimento microbiano nessa região (STEINAUER et al., 2016). Porém, a decomposição da camada F também disponibiliza grande quantidade de C orgânico (PAPA et al., 2013), e pode estar favorecendo grupos diferentes daqueles selecionados na rizosfera, visto a diferença na estrutura da comunidade microbiana dessas regiões. Também foi observado um gradiente de estrutura das comunidades microbianas na pastagem, com destaque para as diferentes comunidades formadas na serapilheira. Esse resultado, juntamente aos observados na floresta, reforçam que as camadas orgânicas não devem ser entendidas como uma estrutura única e homogênea do solo. Além disso, o gradiente observado na pastagem era menor em relação ao da floresta, e este pode ser um impacto direto da

mudança do uso da terra devido à alteração das camadas orgânicas. Enquanto na floresta o gradiente de mudança na composição de espécies não apresentou limites bem definidos entre várias camadas, os limites entre as comunidades foram marcadamente definidos na pastagem.

Estudos anteriores na Amazônia brasileira apontaram que a conversão da floresta para pastagens e campos agrícolas é capaz de aumentar a diversidade alfa de bactérias no solo, principalmente devido às alterações nas propriedades químicas do solo (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; NAVARRETE et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; PEDRINHO et al., 2019). Foi testada a hipótese de que a diversidade alfa da floresta seria maior do que a de uma pastagem se as camadas orgânicas fossem consideradas. Uma abordagem similar foi utilizada por Rocha et al. (2021), porém sem considerar a serapilheira da pastagem. Ao contrário do verificado por esses autores, foi verificado um acúmulo de material vegetal sobre o solo da pastagem e, portanto, utilizou-se a mesma abordagem da floresta para estudar esse sistema de uso da terra. A diversidade alfa do piso da pastagem seguiu significativamente superior à do piso da floresta. Rocha et al. (2021) observaram uma maior diversidade alfa para o piso da floresta em relação ao solo mineral da pastagem em diferentes regiões distantes geograficamente, o que também foi verificado neste estudo. Isso evidencia o incremento em diversidade ocasionado pela adição das camadas orgânicas nas análises. De fato, comparando os valores de diversidade do solo mineral de ambos os locais com os valores de piso da floresta e piso da pastagem, observou-se um incremento considerável em todas as escalas de diversidade para ambos os usos da terra, exceto para a diversidade beta da pastagem. Assim, existe uma diversidade intrínseca às camadas orgânicas subestimada com a metodologia de coleta atual. Para a diversidade beta, comparando o solo mineral da floresta e da pastagem, não houve diferença global significativa. Ainda não existe um consenso de como a mudança do uso da terra pode afetar a diversidade beta do solo e se mudanças podem ser características do local de estudo. Já foi observado o aumento (CARVALHO et al., 2016, ROCHA et al., 2021) e a diminuição (RODRIGUES et al., 2013) da diversidade beta em pastagens de diferentes regiões da Amazônia. Parâmetros como pH e diversidade de plantas já foram sugeridos como possíveis preditores de diversidade beta (PROBER et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). Também não houve diferença na diversidade beta ao comparar o piso da floresta e o piso da pastagem, apesar do maior número efetivo de comunidades na floresta, principalmente em riqueza de ASV ($q = 0$). O incremento da

diversidade beta ocasionado pela adição das camadas orgânicas apenas na floresta, pode ser um indício da influência da diversidade de plantas na heterogeneidade das comunidades microbianas do solo (MITCHEL et al., 2010; ZINGER et al., 2011; PROBER et al., 2014). A diversidade gama também não foi alterada entre o piso da floresta e o piso da pastagem, mas os incrementos em relação aos seus respectivos solos minerais foram observados. Essa igualdade da diversidade beta e gama entre os sistemas de uso da terra, apesar de não indicar uma homogeneização biótica como em Rodrigues et al. (2013), não exclui a possibilidade de redução de funções microbianas essenciais e resiliência do ecossistema às perturbações, pois como discutido anteriormente, a estrutura da comunidade microbiana da floresta é diferente daquela observada na pastagem.

Além da composição, diversidade e estrutura das comunidades de bactérias, foi investigada a abundância de microrganismos do ciclo do N, por meio da quantificação de genes funcionais e taxonômicos de Bacteria e Archaea. Esse ciclo é chave para a manutenção de ambientes florestais e agrícolas e os microrganismos estão envolvidos em todas as principais etapas de transformação do N. Assim, estudá-lo permitiu destacar a importância das camadas orgânicas como reservatórios de grupos-chave envolvidos na ciclagem de nutrientes.

Comunidades de Bacteria e Archaea foram especialmente abundantes nas camadas orgânicas, tanto na floresta quanto na pastagem. Todos os grupos avaliados, ou seja, fixadores de nitrogênio, oxidadores de amônia (AOA e AOB) e desnitrificadores, foram mais abundantes nas camadas orgânicas tanto da floresta como da pastagem. Na floresta, a camada H₂ foi associada às abundâncias absolutas mais elevadas para todos os genes funcionais, assim como a camada F, da pastagem (exceto para AOB, mais abundante em L). Esses resultados indicam que as principais transformações do N podem estar acontecendo mais intensamente acima do solo mineral e, portanto, desconsiderar as camadas orgânicas subestima a abundância dos microrganismos envolvidos. É reconhecido que a quantificação dos genes não reflete o potencial biológico total para a ciclagem de N, mas, assim como para a diversidade de microrganismos, mais uma vez essas camadas destacam-se como possíveis compartimentos chave para a manutenção do sistema e merecem mais atenção nos estudos de ecologia microbiana.

A mineralização da serapilheira, as interações planta-microrganismos e a própria interação entre os grupos do ciclo do N podem ter sido fatores importantes para o enriquecimento dos genes funcionais nas camadas orgânicas. A elevada abundância de diazotróficos, AOA e AOB nas camadas orgânicas também pode estar relacionada com a

presença desses grupos na filosfera do dossel da floresta e das plantas da pastagem, onde também já foi detectada a ocorrência de fixação assimbiótica de nitrogênio e nitrificação (PAPEN et al., 2002; GUERRIERI et al., 2015; WATANABE et al., 2016; GUERRIERI et al., 2020; FÜRNKRANZ et al., 2008; STANTON et al., 2019; VAN LANGENHOVE et al., 2020; MOREIRA, et al. 2021). Dessa forma, as transformações do N no dossel das plantas também passa a representar um importante compartimento não quantificado acima do solo mineral, além de atuar como um constante inóculo microbiano para a serapilheira. Na Amazônia, já foram observadas taxas de fixação assimbiótica de nitrogênio na serapilheira superiores à do solo mineral (MOREIRA et al., 2021), apesar dessas taxas ainda serem controversas para outros ambientes (REED et al., 2008; VAN LANGENHOVE et al., 2020;2021). Em relação à nitrificação, são raros os estudos que relacionam esse processo à serapilheira (ADAMS, 1987). Entretanto, sabe-se que algumas gramíneas podem emitir N₂O de suas folhas, provavelmente através do transporte do gás no solo (BOWATTE et al., 2014), mas AOB já foram observadas em folhas de pastagem emitindo N₂O (BOWATTE et al., 2015). Diante disso, se as abundâncias de AOA e AOB são maiores nas camadas orgânicas, as taxas de emissão de gases de efeito estufa podem estar sendo subestimadas com a exclusão da serapilheira, inclusive em sistemas agrícolas e pastoris.

A baixa concentração de O₂, compostos orgânicos facilmente disponíveis como fonte de energia e presença de nitrato são fatores que favorecem a desnitrificação (GALLAND et al, 2019). Esses fatores podem ser encontrados em regiões do solo como a rizosfera (ACHOUAK et al., 2019). Entretanto, curiosamente, na pastagem, *nirS* e *nosZ* foram mais abundantes na serapilheira, o que também poderia ter efeito na emissão de gases de efeito estufa. Calculamos a razão *nirS/nosZ* (Apêndice I) e os maiores valores foram relacionados às camadas compostas por folhas, em ambos os ambientes, indicando que a serapilheira pode ser responsável por maior emissão de N₂O via desnitrificação em relação às demais camadas do solo. As emissões de N₂O já foram correlacionadas com a abundância de *nirS* (MORALES et al., 2010; RASCHE et al., 2011), entretanto, o gene *nirK*, que codifica nitrito redutase contendo cobre, não foi analisado neste estudo e pode contribuir com outros importantes resultados não observados em nossos dados.

As camadas H, na floresta, e F, na pastagem se destacaram, principalmente em diversidade e abundância de genes funcionais, e, de acordo com a composição da comunidade são, claramente, zonas de transição entre a serapilheira e solo mineral.

Assim, é possível comparar essas regiões do solo a ecótonos. Na Ecologia geral, ecótonos representam zonas de transição entre dois ambientes opostos, com a mistura de espécies desses ambientes, mas também podendo ter espécies endêmicas, resultando em elevada riqueza de espécies. Com base nesse papel de transição e aos resultados de diversidade, sugere-se que as camadas orgânicas são regiões estratégicas de manutenção da biodiversidade do solo sendo sua conservação de elevada importância para a manutenção dos ciclos de nutrientes. Mesmo que os incêndios não venham a destruir a floresta completamente, a destruição dessas camadas pelo fogo pode alterar de forma significativa a dinâmica da floresta, não só pela deposição de cinzas e nutrientes, mas, também, pela eliminação de grupos microbianos importantes para a manutenção normal dos ciclos biogeoquímicos.

5 CONCLUSÃO

As camadas orgânicas tanto da floresta, quanto da pastagem abrigaram considerável diversidade de bactérias, contribuindo para os valores de diversidade de ambos os sistemas. Ainda assim, a diversidade alfa seguiu maior na pastagem. Entretanto, a inclusão das camadas orgânicas foi importante para detectar maior diversidade beta na floresta. Além disso, maior abundância da maioria dos genes funcionais do ciclo do N foi detectada nessas camadas, inclusive na pastagem. Esses resultados sugerem que maior atenção deve ser atribuída às camadas orgânicas dos solos florestais e de sistemas agrícolas nos estudos de ecologia microbiana, pois certamente são fundamentais para a manutenção desses ecossistemas.

REFERÊNCIAS

- ACHOUAK, W. *et al.* **Plant hosts control microbial denitrification activity.** FEMS Microbiology Ecology, v. 95, p. fiz021, 2019.
- ADAMS, J.A. **Nitrification and ammonification in acid forest litter and humus as affected by peptone and ammonium-n amendment.** Soil Biology and Biochemistry, v. 18, p. 45-51, 1986.
- ANDERSON, M.J. **A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.** Austral Ecology, v. 26, p. 32–46, 2001.
- ARNHOLD, E. **Easyanova: analysis of variance and other important complementary analyses.** R Package, 2019.
- BAKKE, I. *et al.* **PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: a simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA.** Journal of Microbiological Methods, v. 84, p. 349–351, 2011.
- BALDRIAN, P. *et al.* **Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition.** The ISME Journal, v. 6, p. 248-258, 2012.
- BOWATTE, S. *et al.* **Bacteria on leaves: a previously unrecognized source of N₂O in grazed pastures.** The ISME Journal, v. 9, p. 265-267, 2015.
- BROCKETT, B.F.T. *et al.* **Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada.** Soil Biology and Biochemistry, v. 44, p. 9-20, 2012.
- CALLAHAN, B.J. *et al.* **Dada2: high-resolution sample inference from illumine amplicon data.** Nature Methods, v. 13, p. 581-583, 2016.
- CAPORASO, J.G. *et al.* **Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample.** PNAS, v. 108, p. 4516–4522, 2011.
- CARVALHO, T.S. *et al.* **Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria.** Ecology, v. 97, p. 2760-2771, 2016.
- CHAO, A.; CHIU, C.H.; JOST, L. **Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers.** Annual Review Ecology, Evolution and Systematics, v. 45, p. 297–324, 2014.
- CHAPMAN, S.K.; NEWMAN, G.S. **Biodiversity at the plant-soil interface: microbial abundance and community structure respond to litter mixing.** Oecologia, v. 162, p. 763-769, 2010.

- COOLS, N. *et al.* **Tree species in the major factor explaining C:N ratios in European forest soils.** *Forest Ecology and Management*, v. 311, p. 3-16, 2014.
- FRANCIS, C.A. *et al.* **Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean.** *PNAS*, v. 102, p. 14683–14688, 2005.
- FÜRNKRANZ, M. *et al.* **Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica.** *The ISME Journal*, v. 2, p. 561-571, 2008.
- GALLAND, W. *et al.* **Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: a strategy to improve plant nutrition and growth.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 136, p. 107513, 2019.
- GARAY, I.; KINDEL, A.; JESUS, R. M. **Diversity of humus forms in the Atlantic Forest ecosystems (Brazil).** *The Table-Land Atlantic Forest. Acta Oecologica*, v. 16, p. 553-570, 1995.
- GROSSO, F.; BÅÅTH, E.; DE NICOLAA, F. **Bacterial and fungal growth on different plant litter in Mediterranean soils: Effects of C/N ratio and soil pH.** *Applied Soil Ecology*, v. 108, p. 1-7, 2016.
- GUERRIERI, R. *et al.* **Partitioning between atmospheric deposition and canopy microbial nitrification into throughfall nitrate fluxes in a Mediterranean forest.** *Journal of Ecology*, v. 108, p. 626-640, 2020.
- GUERRIERI, R. *et al.* **Isotopic evidence for the occurrence of biological nitrification and nitrogen deposition processing in forest canopies.** *Global Change Biology*, v. 21, p. 4613-4626, 2015.
- 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 Environmental Microbiology*, v. 72, p. 5151, 2006.
- HERRERA, R. *et al.* **Amazon ecosystems, their structure and functioning with particular emphasis on nutrients.** *Interciencia*, v. 3, p. 223-232, 1978.
- HOBARA, S. *et al.* **Variation in soil macro-fauna diversity in seven humus orders of a Parrotio-Carpinetum forest association on Chromic Cambisols of Shast-klateh area in Iran.** *Eurasian Soil Science*, v. 50, p. 341-349, 2017.
- JESUS, E.D. *et al.* **Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils.** *The ISME Journal*, v. 3, p. 1004-1011, 2009.
- JOST, L. **Entropy and diversity.** *Oikos*, v. 113, p. 363–375, 2006
- KANDELER, E. *et al.* **Abundance of *narG*, *nirS*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p. 5957-5962, 2006.

- KHAN, M.A.W. *et al.* **Deforestation impacts network co-occurrence patterns of microbial communities in Amazon soils.** FEMS Microbiology Ecology, v. 95, p. fiy230, 2019.
- KINDEL, A.; GARAY I. **Humus form in ecosystems of the Atlantic forest, Brazil.** Geoderma, p. 101-118, 2002.
- KROEGER, M.E. *et al.* **New biological insights into how deforestation in Amazonia affects soil microbial communities using metagenomics and metagenome assembled genomes.** Frontiers in Microbiology, 2018.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. **Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review.** Soil Biology and Biochemistry, v. 83, p. 184–199, 2015.
- LÓPEZ-MONDÉJAR, R. *et al.* **The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics.** Soil Biology and Biochemistry, v. 87, p. 43-50, 2015.
- MARCON, E.; HÉRAULT, B. **entropart: An R package to measure and partition diversity.** Journal of Statistical Software, v. 67, p. 1–26, 2015.
- MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. **Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.** PLoS One, v. 8, e. 61217, 2013
- MENDES, L.W. *et al.* **Soil-borne microbiome: linking diversity to function.** Microbial Ecology, v. 70, p. 255–65, 2015.
- MENDIBURU, F. **Agricolae: statistical procedures for agricultural research.** R Package, 2020.
- MERLOTI, L.F. *et al.* **Forest-to-agriculture conversion in Amazonia drives soil microbial communities and n-cycle.** Soil Biology and Biochemistry, v. 137, 2019.
- MITCHELL, R.J. *et al.* **Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community?** Plant and Soil, v. 333, p. 417-430, 2010.
- MUELLER, R.C. *et al.* **Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest.** The ISME Journal, v. 8, p. 1548–1550, 2014.
- MUNDRA, S. *et al.* **Soil depth matters: shift in composition and inter-kingdom co-occurrence patterns of microorganisms in forest soils.** FEMS Microbiology Ecology, v. 97, p.fiab022, 2021.
- MORALES, S.E.; COSART, T.; HOLBEN, W.E. **Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils.** The ISME Journal, v. 4, p. 799-808, 2010.

- MOREIRA, J.C.F. *et al.* **Asymbiotic nitrogen fixation in the phyllosphere of the Amazon forest: Changing nitrogen cycle paradigms.** *Science of the Total Environment*, v. 773, p. 145066, 2021.
- NAVARRETE, A.A. *et al.* **Land-use systems affect archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soil.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 1527-1540, 2011.
- NAVARRETE, A.A. *et al.* **Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation.** *Molecular Ecology*, v. 24, p. 2433-2448, 2015.
- NIE, H. *et al.* **How do tree species characteristics affect the bacterial community structure of subtropical natural mixed forests?** *Science of the Total Environment*, v. 76, p. 144633, 2021.
- OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: community ecology package.** R Package, 2020.
- PAPA, S. *et al.* **Microbial enzyme activities, fungal biomass and quality of the litter and upper soil layer in a beech forest of south Italy.** *European Journal of Soil Science*, v. 65, p. 274-285, 2013.
- PAPEN, H. *et al.* **Chemolithoautotrophic nitrifiers in the phyllosphere of a spruce ecosystem receiving high atmospheric nitrogen input.** *Current Microbiology*, v. 44, p. 56-60, 2002.
- PAULA, F.S. *et al.* **Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities.** *Molecular Ecology*, v. 23, p. 2988–2999, 2014.
- PEDRINHO, A. *et al.* **Forest-to-pasture conversion and recovery based on assessment of microbial communities in Eastern Amazon rain forest.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 95, p. fy236, 2019.
- PEI, Z. *et al.* **Leaf litter diversity alters microbial activity, microbial abundances, and nutrient cycling in a subtropical forest ecosystem.** *Biogeochemistry*, v. 134, p. 163-181, 2017.
- PROBER, S.M. *et al.* **Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide.** *Ecology Letters*, v. 18, p. 85-95, 2015.
- PONGE, J.F. **Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 35, p. 935-945, 2003.
- QUAST, C. *et al.* **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. D590-D596, 2013.
- QUESADA, C.A. *et al.* **Soils of Amazonia with particular reference to the RAINFOR sites,** *Biogeosciences*, v. 8, p. 1415–1440, 2011.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RASCHE, F. *et al.* **Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest**. *The ISME Journal*, v. 5, p. 389-402, 2011.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. **Relationships among phosphorus, molybdenum and free-living nitrogen fixation in tropical rain forests: results from observational and experimental analyses**. *Biogeochemistry*, v. 114, p. 135-147, 2013.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. **Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest**. *Ecology*, v. 89, p. 2924–2934, 2008.

RITTER, C.D. *et al.* **High-throughput metabarcoding reveals the effect of physicochemical soil properties on soil and litter biodiversity and community turnover across Amazonia**. *PeerJ*, v. 6, e. 5661, 2018.

ROCHA, F. I. *et al.* **Land-use system and forest floor explain prokaryotic metacommunity structuring and spatial turnover in Amazonian forest-to-pasture conversion areas**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 657508, 2021.

RODRIGUES, J. L. *et al.* **Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities**. *PNAS*, v. 110, p. 988–993, 2013.

ROTHAUWE, J.H., WITZE, K.P., LIESACK, W. **The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, p. 4704–4712, 1997.

SALMON, S. **Changes in humus forms, soil invertebrate communities and soil functioning with forest dynamics**. *Applied Soil Ecology*, v. 123, p. 345-354, 2018.

SALMON, S.; GEOFFROY, J.J.; PONGE, J.F. **Earthworms and collembola relationships: effects of predatory centipedes and humus forms**. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, p. 487-495, 2005.

SANTOJA, M. *et al.* **Contrasting responses of bacterial and fungal communities to plant litter diversity in a Mediterranean oak forest**. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 125, p. 27-36, 2018.

SOUZA-JUNIOR, C.M. *et al.* **Reconstructing Three Decades of Land Use and Land Cover Changes in Brazilian Biomes with Landsat Archive and Earth Engine**. *Remote Sensing*, v. 12, p. 2735, 2020.

- STANTON, D.E. *et al.* **Rapid fixation by canopy microbiome in tropical forest determined by both phosphorus and molybdenum.** *Ecology*, v. 100, e. 02795, 2019.
- STARK, N. M.; JORDAN, C. F. **Nutrient retention by the root mat of an Amazonian rain forest.** *Ecology*, v. 59, p. 434–437, 1978.
- STEINAUER, K.; CHATZINOTAS, A.; EISENHAUER, N. **Root exudate: the link between plant diversity and soil microorganisms?** *Ecology and Evolution*, v. 6, p. 7387-7396, 2015.
- THOMPSON, L. R. *et al.* **A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity.** *Nature*, v. 551, p. 457-463, 2017.
- TOUTAIN, F. **Les humus forestiers. Structures et modes de fonctionnement.** *R. Forest. Française*, v. 33, p. 449-477, 1981.
- TRAP, J. *et al.* **Humus macro-morphology and soil microbial community changes along a 130-yr-old *Fagus sylvatica* chronosequence.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, p. 1553-1562, 2011.
- URBANOVÁ, M.; SNAJDR, J.; BALDRIAN, P. **Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees.** *Soil biology and Biochemistry*, v. 84, p. 56-64, 2015.
- VAN LANGENHOVE, L. *et al.* **Comparable canopy and soil free-living nitrogen fixation rates in a lowland tropical forest.** *Science of the Total Environment*, v. 754, p. 142202, 2021.
- VAN LANGENHOVE, L. *et al.* **Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield.** *Plant Soil*, v. 450, p. 93-110, 2020.
- ZANELLA, A. *et al.* **Humusica 1, article 5: terrestrial humus systems and forms – keys of classification of humus systems and forms.** *Applied Soil Ecology*, v. 122, p. 75-86, 2018.
- ZINGER, L. *et al.* **Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape.** *PLOS ONE*, v. 6, e. 19950, 2011.
- ZHENG, H. *et al.* **The quality of the waste drives the differentiation of microbial communities in the litter horizon in an ecotone of the alpine tree line on the Tibetan Plateau.** *Scientific Reports*, v. 8, p. 10029, 2018.
- WAN, X. *et al.* **Soil C:N ratio is the major determinant of soil microbial community structure in subtropical coniferous and broadleaf forest plantations.** *Plant and Soil*, v. 387, p. 103-116, 2015.
- WALLENSTEIN, M.D., VILGALYS, R.J. **Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils.** *Pedobiologia*, v. 49, p. 665–672, 2005.

WATANABE, K. *et al.* **Microbial nitrification in throughfall of a Japanese cedar associated with archaea from the tree canopy.** Springer Plus, v. 5, p. 1596, 2016.

YAN, J. *et al.* **Plant and litter composition selects different soil microbial structures and in turn drives different litter decomposition pattern and soil carbon sequestration capability.** Geoderma, v. 319, p. 194-203, 2018.

YU, Y.; LEE, C.; KIM, J. HWANG, S. **Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction.** Biotechnology and Bioengineering, v. 89, p. 670-679, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Primers, estirpes padrão e condições de amplificação dos genes taxonômicos e funcionais do ciclo do N para análise de qPCR.

Gene	Padrões	Primer	Sequências (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Volume de primer (ul)	Concentração do primer (pmol)	Referências dos primers	Condições de amplificação
16S rRNA Bacteria	DSM 50090 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Eub 338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	180	1	5	Bakke et al. (2011)	95°C-10min; 40 ciclos of 95°C-30s, 53°C-40s, 72°C-40s; 95°C-15s, 53°C-1min, 95°C-15s
		Eub 518r	ATTACCGCGGCTGCTGG					
16S rRNA Archaea	DSM 23604 <i>Methanolinea mesophila</i>	ARC787f	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC	273	1	5	Yu et al. (2005)	95°C-10min; 40 ciclos of 95°C-15 s, 57°C-20s, 72°C-30s; 95°C-15s, 57°C-1min, 95°C-15s
		ARC1059r	GCCAT GCACC WCCTC T					
<i>nifH</i>	DSM 17167 <i>Paraburkholderia phymatum</i>	F	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	457	1	5	Wallenstein & Vilgalys (2005)	95°C-10min; 40 ciclos of 95°C-1min, 53°C-27s, 72°C-1min; 95°C-15s, 53°C-1min, 95°C-15s
		R	TTGTTSGCSGCRATACATSGCCATCAT					
<i>amoA</i> Bacteria	DSM 28437 <i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>amoB</i> 1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	1	0.2	Rotthauwe et al. (1997)	95°C-10min; 40 ciclos of 95°C-45s, 60°C-45s, 72°C-45s; 95°C-15s, 60°C-1min, 95°C-15s
		<i>amoB</i> 2R	CCCCTCKGSAAGCCTTCTC					
<i>amoA</i> Archaea	<i>Nitrososphaera viennensis</i>	<i>amoA</i> 1F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	0.56	0.7	Francis et al. (2005)	95°C-5min, 40 ciclos of 95°C-40s, 56°C-30s, 72°C-1min; 95°C-15s, 56°C-1min, 95°C-15s
		<i>amoA</i> 2R	GCGCCATCCATCTGTATGT					
<i>nirS</i>	DSMZ 1690 <i>Nitrospirillum brasilense</i> Sp7	4 QF	G TSAACGYSAAGGARACSGG	410	0.67	0.3	Kandeler et al. (2006)	95°C-10min; 6 ciclos of 95°C-15s, 63°C-30s, 72°C-40s; 38 ciclos of 95°C-15s, 58°C-30s, 72°C-40 s; 95°C-15s, 58°C-1min, 95°C-15s
		6 QR	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA					
<i>nosZ</i>	BR 11003 <i>Nitrospirillum brasilense</i>	2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG	267	1	5	Henry et al. (2006)	95°C-10 min; 4 ciclos of 95°C-20s, 63°C-30s, 72°C-30s; 40 ciclos of 95°C-20s, 60°C-20s, 72°C-30s; 95°C-15s, 60°C-1min, 95°C-15s
		2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA					

*DSMZ – código de referência para estirpes do Leibniz Institute DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*); BR – código de referência para estirpes do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner Biological (CRB-JD), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, usadas para construção de curvas padrão para qPCR.

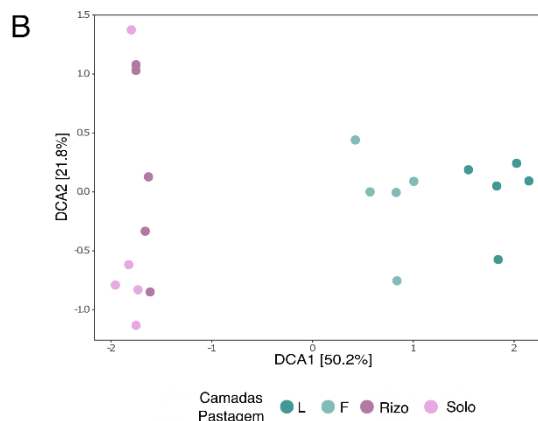
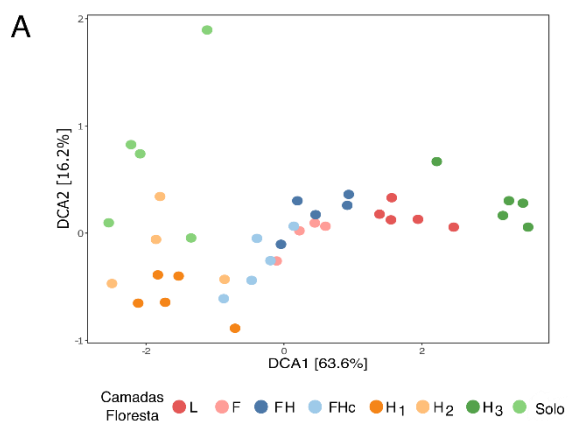
APÊNDICE B – Propriedades químicas das camadas orgânicas da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições.

Propriedades	Unidade	Floresta					Pastagem	
		L	F	FHc	H ₁	H ₂	L	F
N	g Kg ⁻¹	13.1 ± 2.5	16.3 ± 2.6	18.8 ± 2.9	12.8 ± 5.6	12.6 ± 2.6	7.35 ± 1.2	7.5 ± 2.3
P	g Kg ⁻¹	272.2 ± 102.3	318.8 ± 75.1	294.0 ± 67.1	156.7 ± 64.7	126.6 ± 16.2	192.4 ± 45.3	182.6 ± 37
K	mg Kg ⁻¹	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.08	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.09	0.3 ± 0.05
Ca	mg Kg ⁻¹	5325 ± 1670	4145 ± 1027	1576 ± 857	301 ± 35	273 ± 148	5195 ± 504	3840 ± 245
Mg	mg Kg ⁻¹	2054 ± 688.3	1638 ± 716	803 ± 375	282 ± 182	210 ± 148	1298 ± 504	797 ± 225
Cu	mg Kg ⁻¹	85.6 ± 93.9	4.9 ± 1.3	4.02 ± 1.3	1.5 ± 0.5	0.26 ± 0.6	5.13 ± 2.3	3.42 ± 0.9
Fe	mg Kg ⁻¹	149.2 ± 45.8	269.6 ± 47.4	398.80 ± 75.3	393.40 ± 156.5	383.40 ± 117	344.40 ± 81.8	2514.4 ± 899.9
Mn	mg Kg ⁻¹	90.3 ± 29.5	91.9 ± 37.5	60.24 ± 21.1	17.66 ± 3.9	8.91 ± 3.5	99.34 ± 26.4	94.98 ± 24
Zn	mg Kg ⁻¹	16.5 ± 2.5	19.6 ± 7.9	17.80 ± 6.2	8.29 ± 3.3	7.21 ± 2.2	28.74 ± 3.2	21.08 ± 4
13C	g Kg ⁻¹	466.37 ± 22.5	476.5 ± 20.3	478.24 ± 30.7	417.54 ± 74.1	368.67 ± 29.9	425.13 ± 12.6	247.06 ± 28
15N	g Kg ⁻¹	1.3 ± 0.3	1.64 ± 0.2	1.91 ± 0.3	1.96 ± 0.5	1.61 ± 0.3	0.73 ± 0.2	0.70 ± 0.08
C:N	-	40 ± 8	40 ± 8	25 ± 3	22 ± 4	24 ± 7	57 ± 3	35 ± 5

APÊNDICE C - Propriedades químicas das camadas organominerais da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições.

Propriedades	Unidade	Floresta		Pastagem	
		H ₃	Solo	Solo	Rizosfera
C org	g Kg ⁻¹	82.9 ± 18.1	15.86 ± 3.7	10.62 ± 1.3	17.98 ± 3.8
N	g Kg ⁻¹	5.6 ± 1.0	1.16 ± 0.4	0.96 ± 0.15	1.48 ± 0.3
P	mg Kg ⁻¹	7.4 ± 1.5	2.40 ± 1.5	2.60 ± 2.07	4.40 ± 0.9
Ca ²⁺	cmol Kg ⁻¹	0.8 ± 0.3	0.22 ± 0.08	1.24 ± 0.4	2.08 ± 0.6
Mg ²⁺	cmol Kg ⁻¹	1.0 ± 0.4	0.22 ± 0.005	0.54 ± 0.4	0.8 ± 0.2
K ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.16 ± 0.05	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Na ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.18 ± 0.11	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005
Cu	mg Kg ⁻¹	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.07
Fe	mg Kg ⁻¹	8.13 ± 1.3	3.96 ± 0.9	17.38 ± 4.9	22.90 ± 5.1
Mn	mg Kg ⁻¹	3.46 ± 2.8	0.34 ± 0.3	9.58 ± 2.5	4.81 ± 1.1
Zn	mg Kg ⁻¹	5.30 ± 3.4	0.72 ± 0.2	2.00 ± 0.7	0.93 ± 0.2
Al ³⁺	cmol Kg ⁻¹	3.94 ± 0.9	1.04 ± 0.4	0.01 ± 0	0
pH (H ₂ O)	-	3.82 ± 0.2	4.3 ± 0.3	5.68 ± 0.4	5.76 ± 0.2
13C	g Kg ⁻¹	13.60 ± 2.3	2.43 ± 0.5	1.26 ± 0.2	2.95 ± 0.7
15N	g Kg ⁻¹	0.67 ± 0.09	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.04
C:N	-	20 ± 1	21 ± 6	15 ± 0.4	16 ± 1

APÊNDICE D – Análise de correlação destendenciada (DCA) das camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta (A, C) e da pastagem (B, D), onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com de raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



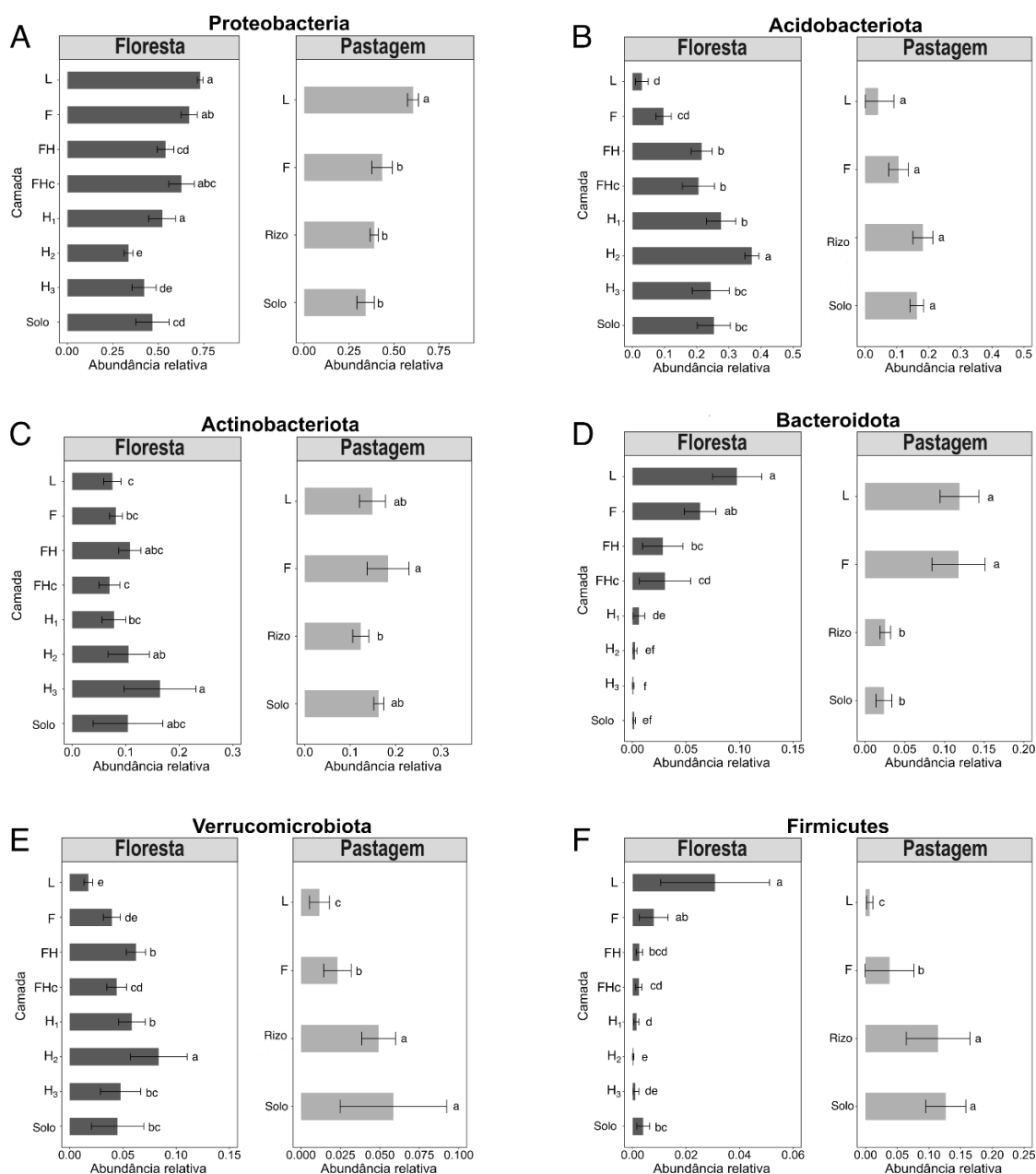
C

	Floresta			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.7481	0.1903	0.1256	0.1125
Valor decorana	0.7679	0.2089	0.1393	0.0837
Comprimento do eixo	6.0828	2.7824	1.7234	1.509

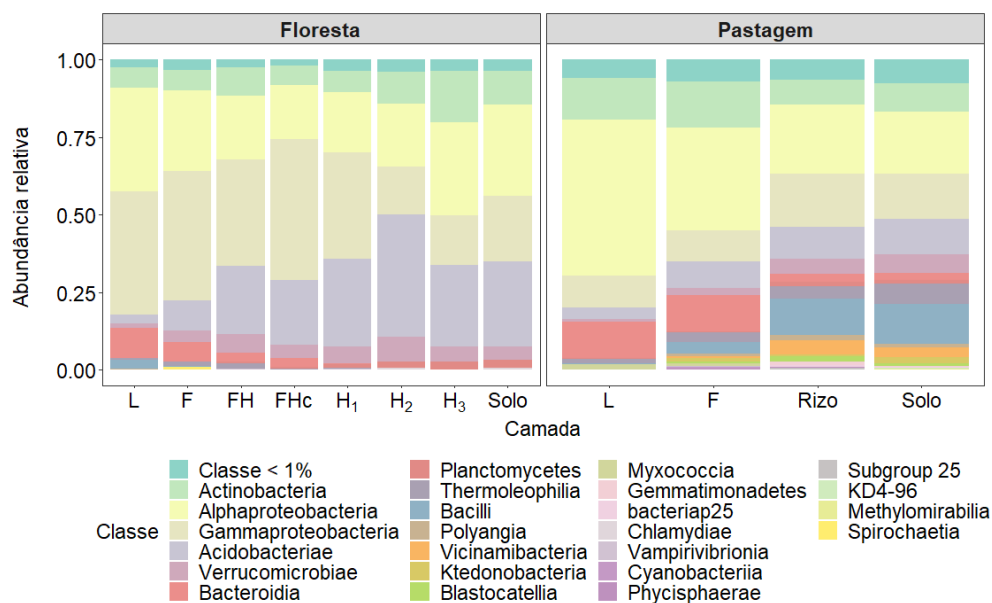
D

	Pastagem			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.7711	0.3348	0.2834	0.1474
Valor decorana	0.8028	0.3715	0.2193	0.1275
Comprimento do eixo	4.6768	2.5667	2.2644	1.6525

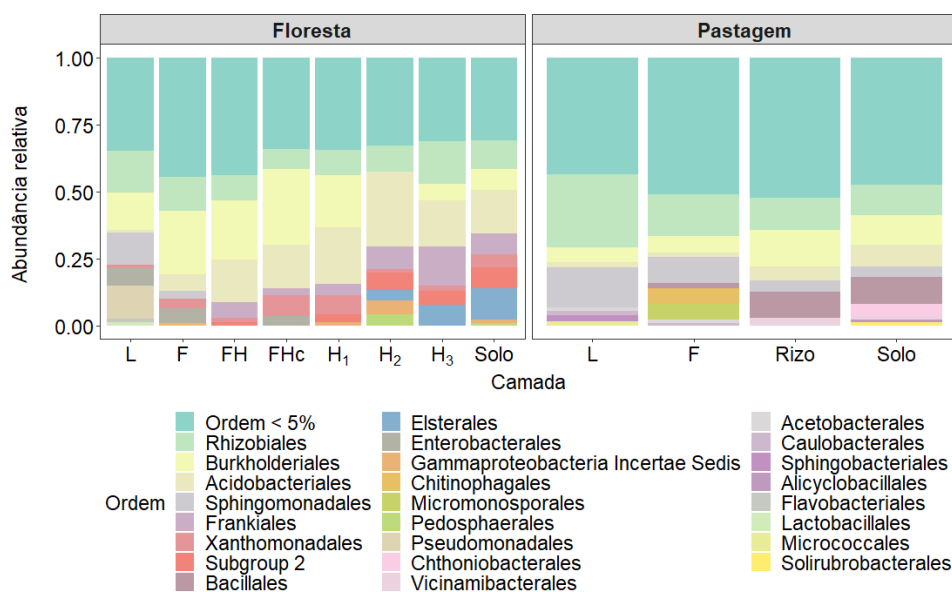
APÊNDICE E – Distribuição da abundância relativa dos principais filos bacterianos nas camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem. Barras indicam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa a 5% pelo teste de Kruskal Wallis. L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



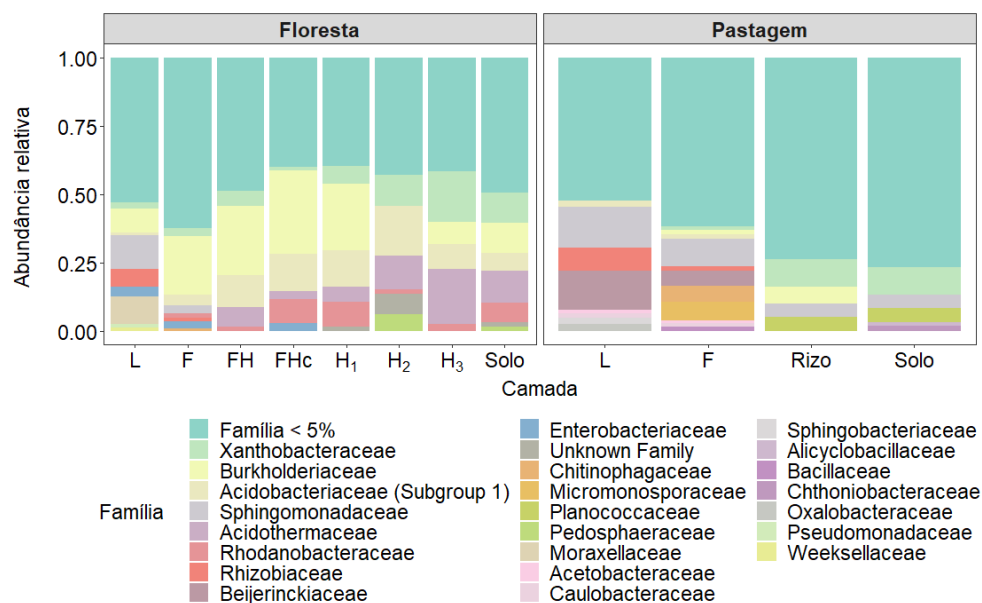
APÊNDICE F – Abundância relativa das classes bacterianas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



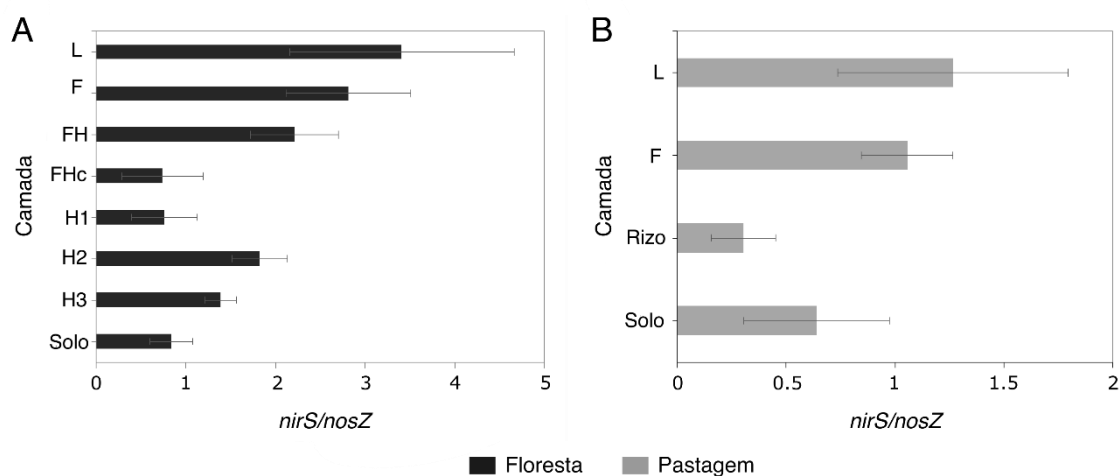
APÊNDICE G – Abundância relativa das ordens bacterianas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



APÊNDICE H – Abundância relativa das famílias bacterianas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



APÊNDICE I – Razão da abundância dos genes funcionais da desnitrificação *nirS/nosZ* nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta (A) e pastagem (B), onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



CAPÍTULO 3 – CONTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS ORGÂNICAS NA DIVERSIDADE DE FUNGOS DOS SOLOS TROPICAIS NA AMAZÔNIA

RESUMO

As camadas orgânicas do solo são um importante habitat para fungos, visto o papel desses microrganismos na decomposição da matéria orgânica e em diversas interações com as plantas e suas raízes. Este estudo avaliou como a comunidade de fungos dessas camadas contribuem para as estimativas de diversidade do solo de uma floresta na Amazônia Oriental e uma pastagem adjacente. Foram amostradas camadas orgânicas da floresta em diferentes estágios de decomposição (L, F, H e suas subdivisões) e solo mineral e, na pastagem, as camadas orgânicas (L e F) e os solos mineral e rizosférico. Foi realizado o sequenciamento do espaçador transcrito interno (ITS) por meio da plataforma Illumina. Os resultados mostraram uma diferenciação de comunidades entre camadas orgânicas e solo mineral tanto para floresta, quanto para pastagem, assim como mudança na composição de fungos entre os dois sistemas de uso do solo. Considerar as camadas orgânicas nas análises de diversidade resultou em um incremento nos valores de todas as escalas de diversidade de ambos os sistemas de uso do solo, exceto para diversidade beta da pastagem devido a maior homogeneidade das comunidades de fungos da camada F. em conclusão, as camadas orgânicas da floresta e da pastagem são compartimentos de significativa diversidade fúngica e podem auxiliar no entendimento dos reais efeitos da mudança do uso dos solos tropicais.

Palavras-chave: ITS, mudança do uso do solo, floresta tropical, serapilheira, diversidade microbiana.

CONTRIBUTION OF ORGANIC LAYERS TO THE DIVERSITY OF FUNGI IN TROPICAL SOILS IN THE AMAZON

ABSTRACT

The organic layers of the soil are an important habitat for fungi, given the role of these microorganisms in the decomposition of organic matter and in various interactions with plants and their roots. This study evaluated how the fungal community of these layers contributes to soil diversity estimates of an Eastern Amazon Forest and an adjacent pasture. Organic layers of the forest in different stages of decomposition (L, F, H and its subdivisions) and mineral soil were sampled and, in the pasture, the organic layers (L and F) and mineral and rhizospheric soils were sampled. The sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) was performed using the Illumina platform. The results showed a differentiation of communities between organic layers and mineral soil for both forest and pasture, as well as a change in the composition of fungi communities between the two land use systems. Considering the organic layers in the diversity analysis resulted in an increase in the values of all diversity scales of both land use systems, except for the pasture's beta diversity due to the greater homogeneity of F layer fungus communities. In conclusion, the organic layers of the forest and pasture are compartments of significant fungal diversity and can help to understand the real effects of changing tropical land use.

Keywords: ITS, land use change, tropical forest, litter, microbial diversity.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos tem um importante papel na ciclagem de nutrientes em solos florestais, uma vez que são responsáveis por grande parte da decomposição da matéria orgânica. Além de decompositores, agem como simbiossiontes ou patógenos obrigatórios de outros organismos (TERDESOO et al., 2016). Entender como as comunidades de fungos se estruturam no solo pode ser importante para prever mudanças nos fluxos globais de carbono e nitrogênio (MGUIRE et al., 2010), principalmente em ambientes fortemente ameaçados pelo desmatamento, como as florestas tropicais da bacia amazônica.

A diversidade de plantas tem efeito sobre as comunidades de fungos através da quantidade e qualidade da serapilheira fornecida e, também, das raízes, que são importantes compartimentos para a interação com fungos simbióticos. O efeito da qualidade do material vegetal é maior nas comunidades de fungos da serapilheira, que se distinguem-se daquelas do solo mineral (BALDRIAN et al., 2012; LUO et al., 2021). Além disso, dentro da serapilheira podem existir diferentes microhabitats, já que o material orgânico apresenta distintos estágios de decomposição. Esses estágios já foram apontados como o fator mais forte na estruturação das comunidades fúngicas do solo de florestas temperadas e boreais (ASPLUND et al., 2019; BALDRIAN et al., 2012; LINDAHL et al., 2007; PAPA et al., 2014). Além de estruturar as comunidades, já foi verificada uma separação funcional das comunidades de fungos ao longo de estratos orgânicos e minerais do solo, onde saprotróficos eram mais abundantes na serapilheira, enquanto biotróficos dominavam a camada de húmus adjacente e horizontes do solo mineral (LINDAHL et al., 2007; ROSLING et al., 2003).

Na floresta Amazônica o compartimento orgânico do solo representa uma importante fonte de nutrientes, já que grande faixa da floresta se estabeleceu sobre solos de baixa fertilidade. Para aumentar a capacidade de absorção dos nutrientes advindos da mineralização da serapilheira, a floresta, estrategicamente, concentra raízes finas nessa região, que se misturam à matéria orgânica em diferentes estágios de decomposição (HERRERA et al., 1978b). Visto o importante papel dos microrganismos na ciclagem de nutrientes e na interação com as raízes das plantas, o horizonte orgânico da Amazônia provavelmente abriga uma elevada diversidade microbiana. Apesar disso, só recentemente esse horizonte tem sido considerado nos estudos de diversidade molecular microbiana (ROCHA et al., 2021; RITTER et al., 2018; RITTER et al., 2020). Recentemente, Rocha et al. (2021) observaram que a camada da serapilheira e de raízes

finas da Amazônia contribuíram fortemente para a diversidade beta de procariotos da floresta. Ritter et al. (2018) não observaram correlação entre OTU de eucariotos da serapilheira e do solo adjacente e encontraram independência dos fatores ambientais que regulam cada substrato. Esses resultados sugerem que parte significativa da diversidade microbiana pode estar acima do solo mineral e que o horizonte orgânico também deve ser considerado nas avaliações de diversidade da Amazônia.

O bioma amazônico detém uma elevada, mas incompreendida diversidade de fungos no solo (MAIA et al., 2020; RITTER et al., 2020) e, devido ao desmatamento, essas comunidades podem ser perdidas antes mesmo de terem sido descritas. A abertura de áreas agrícolas é uma das principais causas de perda de cobertura florestal na Amazônia e, conseqüentemente, de biodiversidade (TYUKAVINA et al., 2017; TIBBET et al., 2020). Frente a essa ameaça, estudos surgiram no sentido de entender os impactos da mudança do uso do solo nas comunidades microbianas e em suas funções. Mudanças ao nível de composição, diversidade e funcionalidade foram observadas, principalmente impulsionadas pelas mudanças nas propriedades químicas do solo (JESUS et al., 2009; NAVARRETI et al., 2011; PAULA et al., 2014). Foi observado que a substituição de entradas de C (raízes, serapilheira) de espécies florestais arbóreas para pastagem modificam a ciclagem de C do solo (KROEGER et al., 2018) e que o desmatamento aumenta a diversidade e abundância de genes de resistência à antibióticos (LEMOS et al., 2021). Grande parte dos estudos foi voltada para diversidade de procariotos e os poucos estudos sobre fungos apresentam divergências em relação à diversidade, sendo relatado o aumento ou diminuição da riqueza e da diversidade com a conversão (CERQUEIRA et al., 2018; FRACETTO et al., 2013; MUELLER et al., 2014, 2016). Apesar disso, em todos os estudos a composição de fungos foi alterada e Muller et al. (2016) observaram um aumento de fungos generalistas na pastagem, indicando que o impacto da conversão pode ser maior sobre fungos especialistas. Em uma floresta tropical da China, a conversão aumentou a abundância de fungos patogênicos facultativos em consequência da redução de saprotróficos (SHI et al., 2019).

Este estudo levantou as hipóteses de que: (1) a diversidade da floresta é maior do que de uma pastagem quando as camadas orgânicas são consideradas devido (2) a essas camadas abrigarem elevada diversidade de microrganismos em relação ao solo mineral. Para validar essas hipóteses, foi realizado o sequenciamento da região ITS de diferentes camadas do horizonte orgânico (folhas inteiras e decompostas da floresta e pastagem;

húmus apenas na floresta) e do solo mineral para avaliar e comparar a composição e diversidade das comunidades de fungos entre os substratos e entre os usos do solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da área e amostragem

O estudo foi realizado no Distrito de São Joaquim do Itaquara, município de Baião, no Estado do Pará, Brasil. Foram coletados material de uma floresta nativa e de uma pastagem adjacente no mês de dezembro de 2017. De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos, os solos foram classificados como Espodossolo na área de floresta e Latossolo, na pastagem. O clima da região é classificado como tropical de monções (Am – Classificação de Köppen), com temperatura média de 26.3°C e pluviosidade média anual de 2.202 mm.

Para a coleta, foi delimitado um transecto de 250 m em cada área, com cinco pontos de coleta igualmente espaçados em 50 m. A distância entre o último ponto de coleta da floresta e o primeiro ponto da pastagem foi de 100 m. Em cada ponto, com auxílio de gabarito metálico de 25 x 25 cm, foram coletadas amostras compostas, formadas por três subamostras, de camadas orgânicas e, também, do solo mineral. Estas foram definidas como camadas L, F e H, que foram subdivididas em subcamadas conforme sua diferenciação morfológica, além dos 10 primeiros cm da porção mineral do solo. A forma de distinção e coleta do material foi baseada em trabalhos de classificação de formas de húmus e no exame visual do material amostrado (TOUTAIN, 1981; PONGE et al., 2003). Na Floresta, foram identificadas e coletadas sete camadas distintas, assim denominadas: L (“litter”); F (“fragmented litter”); uma transição entre F e o horizonte H, aqui denominada FH; H₁, H₂, H₃, que são subdivisões do horizonte H e cujas características são destacadas adiante; e o solo mineral. Já na pastagem, foram identificadas e coletadas as camadas L e F, a porção mineral do solo e o solo rizosférico de plantas de *Urochloa* sp. As demais camadas identificadas na floresta não estavam presentes na pastagem. Daqui em diante, utilizaremos os termos “piso da floresta” e “piso da pastagem” para designar o conjunto de todas as camadas (orgânicas e mineral) desses ambientes.

A camada L era constituída por folhas da serapilheira recém caídas e não fragmentadas. A F se constitui de folhas fragmentadas e pequenas quantidades de material

orgânico fino. A FH é caracterizada por uma abundância de raízes misturada às folhas fragmentadas e contendo uma maior quantidade de matéria orgânica fragmentada com diâmetro menor que 2 mm. A camada H foi subdividida em três subcamadas conforme sua diferenciação morfológica: a primeira, H₁, se caracteriza pela abundância de material orgânico fragmentado e fino, com uma alta abundância de raízes de árvores e outras plantas da floresta; a segunda, H₂, possui visivelmente uma menor abundância de raízes; e a terceira, H₃, se constitui numa transição entre a camada orgânica e o solo mineral, com uma mistura abundante de matéria orgânica e areia. Por fim, a porção mineral se caracterizou por uma textura prioritariamente arenosa.

Após a coleta, as amostras foram peneiradas em malha de 2 mm (exceto L e F das duas áreas) e, posteriormente, armazenadas a -80°C. Dessa forma, foram coletas cinco repetições de oito camadas (incluindo o solo mineral) advindas da floresta e quatro camadas da pastagem (incluindo solo mineral e rizosférico), totalizando 60 amostras.

2.2 Análise química do solo

As análises foram realizadas pelo Polo INOVASOLOS da Embrapa Solos, com base nas recomendações do Manual de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997).

As amostras das camadas orgânicas (L, F, FH, FHg, H₁ e H₂ da floresta e L e F da pastagem) submetidas inicialmente a um bloco digestor (exceto para análise de potássio, que se deu por meio de digestão em micro-ondas). O nitrogênio foi quantificado por destilador Kjeldahl e o potássio por fotômetro de chama. Os demais elementos (P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn) foram analisados por espectrometria de absorção atômica.

Para as camadas organominerais (H₃ da floresta e rizosfera da pastagem) e minerais (solos de floresta e pastagem) foram analisados: carbono orgânico pelo método do dicromato de potássio em meio sulfúrico e titulação; nitrogênio total pelo método Kjeldahl. O micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn foram extraídos por Mehlich-1 e determinadas por espectrometria de absorção atômica. Os cátions Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram extraídos por meio da solução de KCl 1 mol L⁻¹. Para H + Al foi utilizada a solução de acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0. A extração de Na⁺, K⁺ e P foi realizada com solução de H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹ + HCl 0,05 mol L⁻¹. Os teores de Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinados por espectroscopia de absorção atômica; K⁺ e Na⁺ por fotometria de chama; P por espectrofotômetro UV-Vis; Al³⁺ e H + Al por titulometria. As bases trocáveis (ES) foram calculadas pela soma de Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺. A capacidade de troca catiônica (CEC)

foi calculada pela soma de BS e da acidez potencial (H + Al). A saturação por bases (V%) foi calculada como a razão entre cátions trocáveis e CEC, multiplicada por 100.

A análise de abundância natural dos isótopos ^{13}C e ^{15}N foi realizada para todas as amostras pelo Laboratório John Day da Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ, Brasil. As amostras foram secas a 60°C , homogeneizadas e moídas em pó fino em moinho de bola. Após, em triplicata, as amostras foram pesadas em cápsulas de estanho. A quantidade analisada baseou-se nos valores de N total das análises anteriores, dividindo o valor 4 ($40\ \mu$ de N total na amostra, que é a escala máxima de leitura do espectrômetro de massa utilizado - Finnigan MAT, Bremen, Germany) pelo teor de N total (%).

2.3 Extração de DNA e sequenciamento de alto rendimento

Amostras com fragmentos grosseiros (L, F e FH) foram maceradas em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada com o kit DNeasy Power Soil (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 0,25 g de amostras maceradas e 0,50 g das demais. O sequenciamento foi realizado pelo *Institute for Genomics and Systems Biology Next Generation Sequencing* (IGSB-NGS) do Laboratório Nacional de Argonne (Chicago, EUA). A região ITS1 do espaçador transcrito interno (ITS) foi amplificado com os conjuntos de iniciadores ITS1f-ITS2 (EMP.ITSkibir) pela plataforma Illumina MiSeq (2×250 pb paired-end), seguindo os protocolos de amplificação do *Earth Microbiome Project* (THOMPSON et al., 2017).

2.4 Processamento de dados do sequenciamento

As sequências obtidas foram analisadas por meio da pipeline DADA2 para ITS(1.8) (CALLAHAN et al., 2016) incorporada ao software R (R CORE TEAM, 2021). Para isso, utilizou-se o pacote “dada2” (CALLAHAN et al., 2016). As sequências foram desmultiplexadas e filtradas quanto à sua qualidade (Q score menor que 20). Devido à baixa qualidade das sequências reverse, apenas as sequências forward foram mantidas. Foi utilizado o banco de dados UNITE versão 04.02.2020 (ABARENKOV et al., 2020) para atribuição de taxonomia.

2.5 Análises de dados e estatística

As análises dos dados foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2021). Sequências de baixa prevalência e não fúngicas foram descartadas. O comprimento do

gradiente de distribuição das ASVs foi verificado pela análise de correspondência destendenciada (DCA). O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) foi utilizado para visualizar a estrutura das comunidades de fungo entre as camadas, com base na matriz de distância de Bray-Curtis, no pacote *phyloseq*. A análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001) foi aplicada para observar diferenças significativas nas estruturas das comunidades, também com base na matriz de distância de Bray-Curtis no pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2020).

A composição taxonômica das comunidades foi avaliada através da abundância relativa dos níveis taxonômicos. Para medir os índices de diversidade alfa, os dados foram rarefeitos para o menor número de leituras obtido (6724 reads). A análise de partição de diversidade foi realizada utilizando Hill numbers, através do pacote *Entropart* (MARCON; HÉRAULT, 2015). Os Hill numbers geram números efetivos de espécies igualmente frequentes para cada valor de ordem “q” em uma estrutura unificada, tornando possível a interpretação e comparação direta (CHAO et al., 2014). Foram utilizadas as ordens $q=0$ (atribui peso igual a todas as espécies, inclusive às raras, representando a riqueza de espécies), $q = 1$ (exponencial da entropia de Shannon, que atribui às espécies peso proporcional a sua frequência, representando o número de espécies comuns da comunidade) e $q = 2$ (inverso de Simpson, representando espécies dominantes) (JOST, 2006). O particionamento de diversidade foi aplicado em todas as camadas tanto da floresta, quanto da pastagem, assim como para o piso da floresta e o piso da pastagem. Entretanto, para melhorar a visualização dessa análise, as camadas FH e FHc foram analisadas conjuntamente (denominadas FH), assim como as camadas H₁, H₂ e H₃, formando.

Também foram calculadas as medidas de diversidade alfa (Chao1 e Shannon) individualmente para cada camada orgânica e solo mineral e para os sistemas de uso da terra como um todo pelo pacote *phyloseq*.

2.6 Análise de redes de correlação

A análise de rede de correlação foi realizada a fim de observar como as relações taxonômicas se dão nas diferentes camadas da floresta e da pastagem. As redes foram construídas com *SparCC* por meio do pacote *microeco* (LIU et al., 2021) no ambiente R. *SparCC* foi executado com as configurações padrão e apenas associações com $p < 0.01$ e correlações > 0.3 foram mantidas. Os nós das redes representam taxas ao nível de filo e

as arestas, correlações positivas ou negativas entre os nós. Para visualização das redes, foi utilizado o pacote *igraph* e o software *Gephi*, determinando o arranjo com o algoritmo de Fruchterman-Reingold.

2.7 Predição funcional com FunGuild

O banco de dados FUNGuild (NGUYEN et al., 2016) foi utilizado na caracterização funcional dos fungos, ao nível de gênero. Foram determinados os modos tróficos (patotrófico, patotrófico - saprotrófico, saprotrófico - simbiotrófico, patotrófico - simbiotrófico, saprotrófico, saprotrófico - simbiotrófico e simbiotrófico) e guildas, como patógenos animais, patógenos de plantas, fungos parasitas, saprófitas de madeira e saprófitas indefinidos. Apenas os níveis de confiança “altamente provável” e “provável” foram considerados e grupos com modo trófico não atribuído foram removidos. As abundâncias dos modos tróficos foram comparadas dentro de cada uso do solo, por meio do teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância com o método de ajuste FDR (*False Discovery Rate*), pelo pacote *agricolae*.

3 RESULTADOS

3.1 Propriedades químicas do solo

Os nutrientes foram analisados com diferentes metodologias nas camadas de natureza vegetal (L a H₂) e mineral (H₃, solo mineral e solo rizosférico). Portanto, deve-se tomar cuidado nas comparações das concentrações entre as camadas orgânicas e minerais.

Na floresta, a relação C:N diminuiu em profundidade, da camada L para a camada H₂, o que equivale a dizer que ela foi menor em camadas de estágio de decomposição mais avançado (Apêndice B). As concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn diminuiriam no mesmo sentido, enquanto a concentração de Fe aumentou. O P teve maior concentração na liteira e menor no horizonte orgânico (camadas H₁ e H₂). Na pastagem, as concentrações de Ca, Mg, ¹³C e a relação C:N foram maiores na camada L se comparadas à camada F.

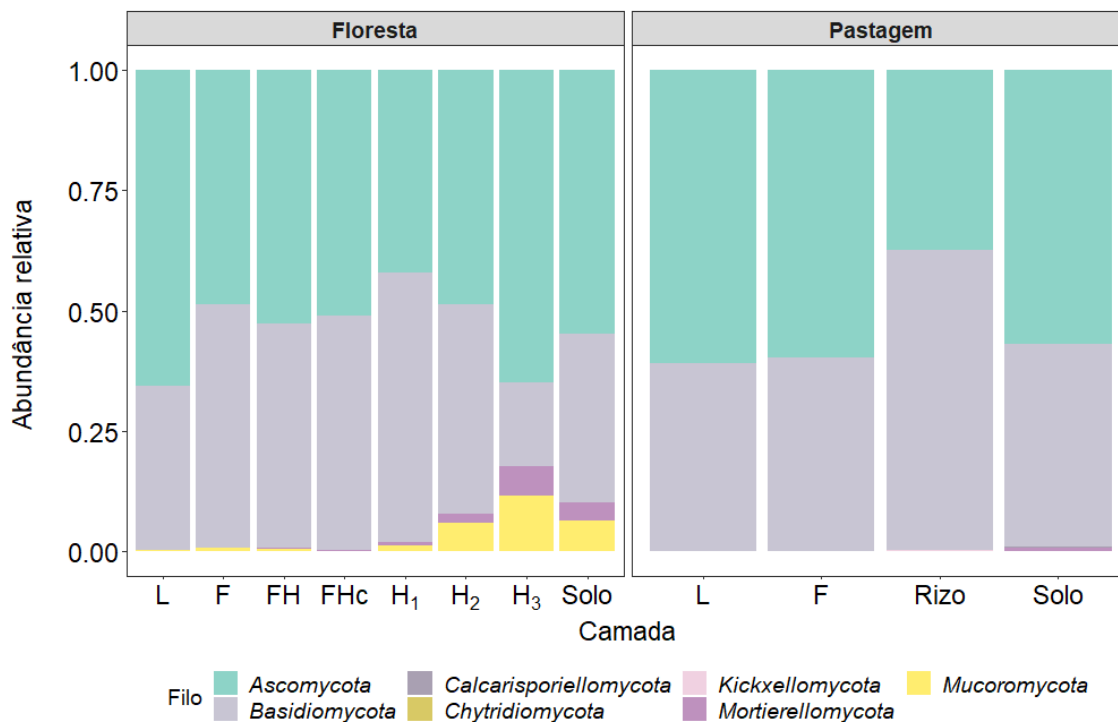
No que diz respeito aos solos (Apêndice C), ambos podem ser considerados ácidos, porém o pH foi significativamente menor no solo da floresta, com média de 4,3 contra 5,68 e 5,76 nos solos mineral e rizosférico da pastagem. O solo da pastagem

apresentou maiores concentrações de Ca, Fe, Mn e Zn. Na floresta, por sua vez, foram observadas maiores concentrações de Al, ^{13}C e C orgânico.

3.2 Composição taxonômica e estrutura das comunidades

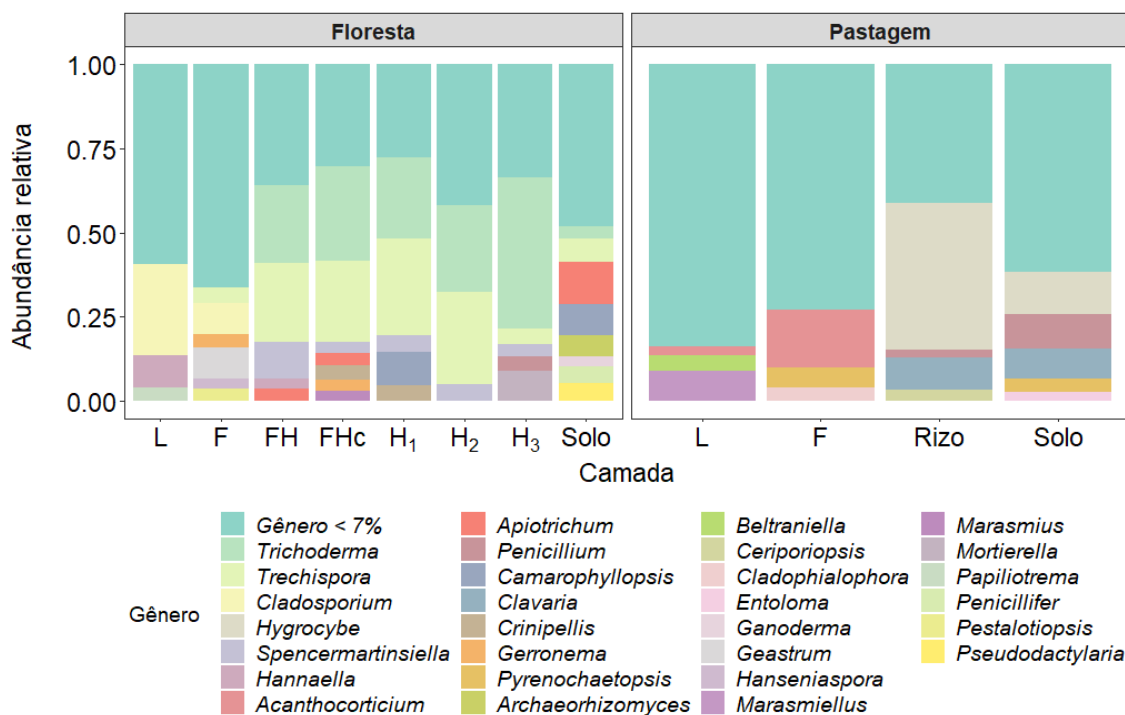
Após a filtragem de quimeras, sequências de origem não fúngica ou não classificadas ao nível de filo (24.6%), atribuímos 915.011 sequências à 11.158 ASVs. Na média geral dos dados, os filos dominantes foram Ascomycota (53.80%) e Basidiomycota (42.59%) e em menor proporção, Mucoromycota (2.34%) e Mortierellomycota (1.21%) (Figura 1). Os demais filos basais tiveram abundância relativa inferior a 1% (Calcarisporiellomycota, Kickxelomycota, Chytridiomycota). O uso da terra não modificou a maior abundância relativa de Ascomycota em relação a Basidiomycota com, respectivamente, 53.6% e 41.4%, na floresta, e 54.3% e 45.3%, na pastagem. Entretanto, em algumas camadas específicas, verificou-se maior abundância de Basidiomycota em relação a Ascomycota com, respectivamente, 50.4% e 48.8% na camada F e 56.1% e 42% em H₁ da floresta e 62.2% e 37.5% na rizosfera da pastagem. As diferenças de porcentagem de Basidiomycota e Ascomycota foram maiores nas camadas de raízes (camada H₁, da floresta, e rizosfera da pastagem). As abundâncias de Mortierellomycota e Mucoromycota foram crescentes em profundidade, principalmente nas camadas de húmus e solo mineral da floresta. Na pastagem, esses filos, juntamente com Calcarisporiellomycota e Kickxelomycota, que apesar das baixas abundâncias (< 1%), estavam mais relacionados ao solo mineral e à rizosfera.

Figura 1 – Abundância relativa de filos fúngicos nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



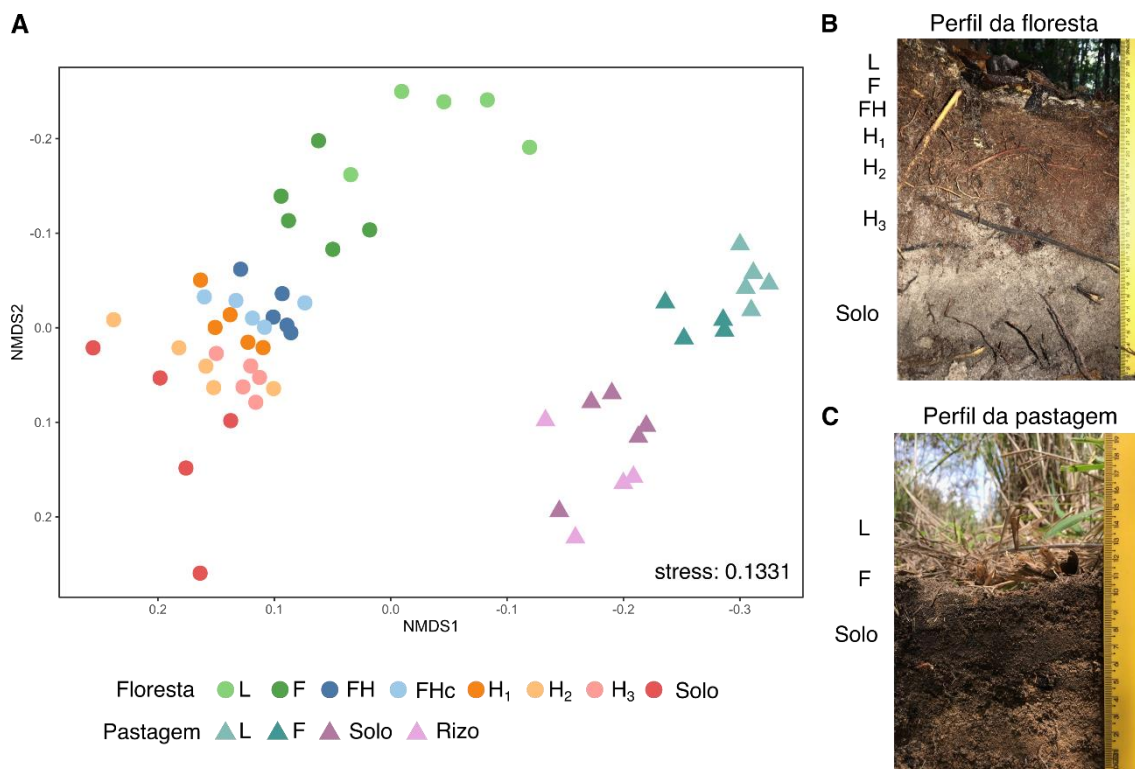
Floresta e pastagem apresentaram distintas composições de gêneros fúngicos (Figura 2). Nas camadas da floresta havia mais gêneros dominantes em relação à pastagem. Para facilitar a interpretação dos dados, foram representados apenas gêneros com abundância relativa acima de 7%. No geral, 53.3% dos gêneros da floresta apresentaram abundância relativa inferior a 7%, contra 87% dos gêneros na pastagem, com destaque para a camada L, com 84.7%. Alguns gêneros se concentravam em camadas específicas, como, por exemplo, *Cladosporium* nas camadas L e F da floresta e *Beltraniella* e *Marasmiellus* em L da pastagem. Em contrapartida, outros gêneros apresentaram presença crescente nas camadas de húmus da floresta, como *Trichoderma* e *Trechispora*, e *Hygrocybe* no solo e rizosfera da pastagem, com destaque para sua presença em 41% das leituras da rizosfera. Para consultar níveis taxonômicos, consultar Apêndices C, D e E.

Figura 2 – Abundância relativa de gêneros fúngicos nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



As diferenças de composição de fungos entre as camadas e os usos do solo, refletiram-se na estrutura das comunidades. A DCA (Apêndice F) revelou um longo gradiente na floresta (8.21 desvios padrão) e na pastagem (8.36 desvios padrão). A NMDS (stress = 0.1331 – Figura 3) mostrou a separação das comunidades da floresta e pastagem em grupos distintos e um gradiente de distribuição e substituição de espécies ao longo do perfil de camadas de cada ambiente. Por meio da PERMANOVA ($F = 1.65$, $p < 0.001$), foram identificadas cinco estruturas de comunidades significativamente diferentes na floresta (L/F, F/FH/FHc, FH/FHc/H₁, H₁/H₂/H₃, H₂/Solo) e apenas duas na pastagem (L/F, Rizo/Solo).

Figura 3 – Análise de escalonamento multidimensional não-métrica (dissimilaridade de Bray-Curtis) das camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e solo mineral da floresta e da pastagem (A), perfil do solo da floresta (B) e da pastagem (C), onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Fonte: Ederson C. Jesus (2018).

3.3 Análise de partição de diversidade

A fim de facilitar a interpretação e visualização dos dados, na análise de partição de diversidade (Figura 4) da floresta as camadas FH e FHc foram unidas e denominadas de FH e as camadas de húmus H₁, H₂ e H₃ também foram unidas e denominadas de H.

Na floresta, as camadas orgânicas apresentaram maior valores de riqueza de ASVs ($q = 0$) em relação ao solo mineral para as escalas de diversidade alfa e gama com maiores valores para FH e L, respectivamente. Para diversidade beta, o número efetivo de comunidades foi maior para as camadas L e F, indicando maior heterogeneidade espacial nessas camadas. Ainda para diversidade beta, o número efetivo de comunidades foi intermediário para o solo mineral e menor para H e FH em todas as ordens. Na pastagem, a rizosfera apresentou os menores valores para todas as ordens das escalas de alfa e diversidade gama e a camada F, os menores valores para diversidade beta.

Comparando o solo mineral da floresta com o da pastagem, os valores riqueza de ASVs foram maiores para o solo mineral da pastagem em todas as escalas de diversidade e, para a diversidade beta, todas as ordens 'q' apresentaram valores maiores também para o solo mineral da pastagem. Entretanto, quando todas as camadas foram consideradas conjuntamente, o piso da pastagem apresentou maior diversidade alfa em relação ao piso da floresta, principalmente para os valores de riqueza de ASVs ($q = 0$) e exponencial de Shannon ($q = 1$). Na diversidade beta, o piso da floresta foi superior para os valores de riqueza de ASVs e exponencial de Shannon e na diversidade gama, apenas na riqueza de ASVs.

3.4 Índices de diversidade alfa individuais

Na análise de diversidade alfa individual para as camadas, na floresta, foi observada maior riqueza de Chao1 nas camadas L e F ($F = 23.4$, $P < 0.001$ – Figura 5A). A riqueza do solo mineral não diferiu das encontradas nas camadas de húmus da floresta. Na pastagem, houve diferença da riqueza entre F e rizosfera ($F = 4.72$, $p = 0.0177$ – Figura 5C). Quanto ao índice de Shannon, na floresta, a diversidade de L foi superior a H_1 , H_3 e solo mineral ($F = 3.60$, $p = 0.0065$ – Figura 5B) e não houve diferença significativa entre as demais camadas. Na pastagem, não houve diferença entre a diversidade de fungos das camadas ($F = 2.27$, $p = 0.1247$ - Figura 5D). Considerando em conjunto todas as camadas de um mesmo sistema de uso do solo, foi observado aumento de riqueza ($F = 7.15$, $p = 0.009$ – Figura 5E) e diversidade ($F = 9.21$, $p = 0.004$ – Figura 5F) na pastagem.

3.5 Análise de redes de correlação

As redes construídas para as camadas da floresta (Figura 6; Apêndice G) indicaram um maior grau de complexidade das interações entre taxa nas camadas de húmus, em especial na camada H_2 . Percebe-se que há uma diminuição em seu diâmetro, número de nós e arestas nas da camada L para a F e FH, com um aumento nas camadas H, atingindo um máximo na camada H_2 . De fato, a camada H_2 apresentou os maiores valores desses parâmetros, além de um maior grau médio e comprimento médio de caminho, o que demonstra sua maior complexidade. As comunidades do solo mineral apresentaram os menores valores desses parâmetros, o que demonstra sua menor complexidade. A modularidade das redes não variou expressivamente entre as comunidades das diferentes camadas. No caso da pastagem, as comunidades do solo

rizosférico e, especialmente, mineral foram as mais complexas, com um maior grau médio, maior número de nós e arestas, maior diâmetro e menor modularidade. A camada com a menor complexidade foi a F, que, em geral, apresentou menores valores desses parâmetros.

Figura 4 – Análise de partição de diversidade para camadas orgânicas e solo mineral da floresta e pastagem. Ordens: $q = 0$, riqueza de ASVs; $q = 1$, exponencial da entropia de Shannon para ASVs igualmente ponderadas; $q = 1$, inverso do índice de Simpson para taxas dominantes.

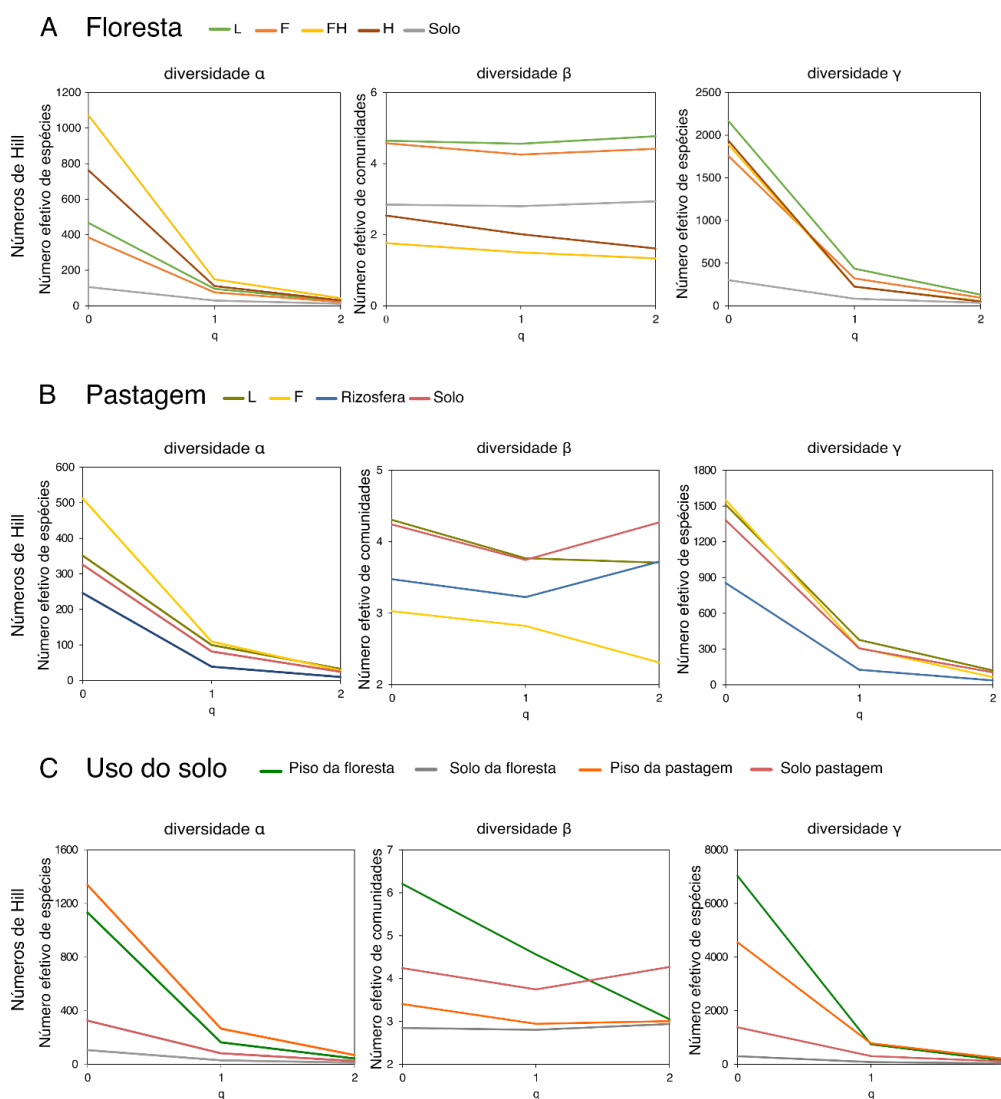
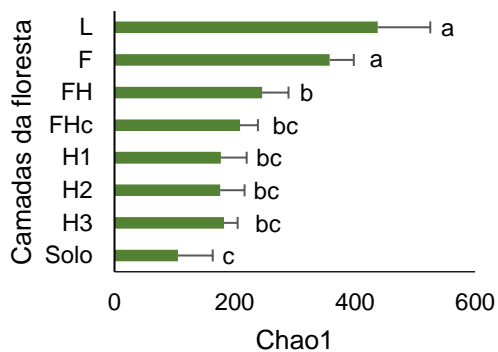


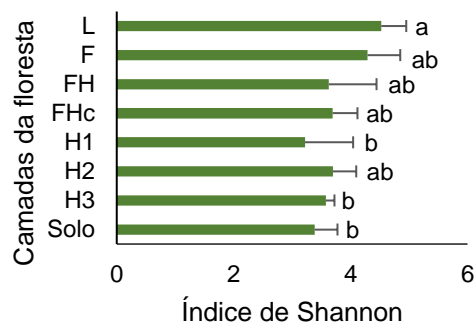
Figura 5 – Riqueza de Chao1 e índice de Shannon para camadas da floresta (A e B, respectivamente), pastagem (C, D) e uso do solo (E, F). Piso da floresta e piso da pastagem representam o cálculo dos índices considerando todas as camadas. Barras representam desvio padrão das repetições. Letras diferentes representam diferença significativa entre as camadas pelo teste de Tukey a

5% de significância. L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

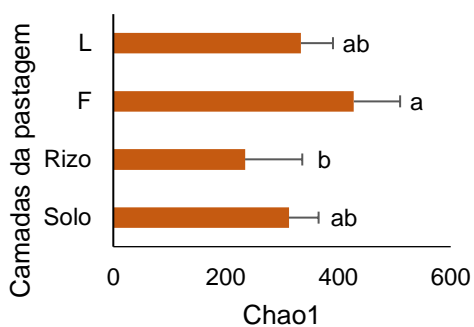
A



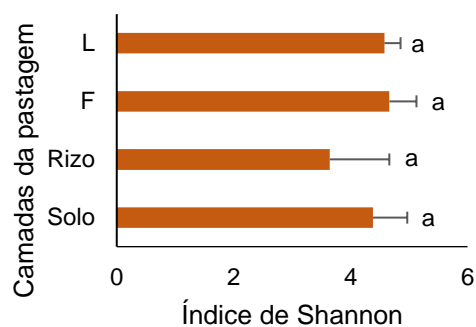
B



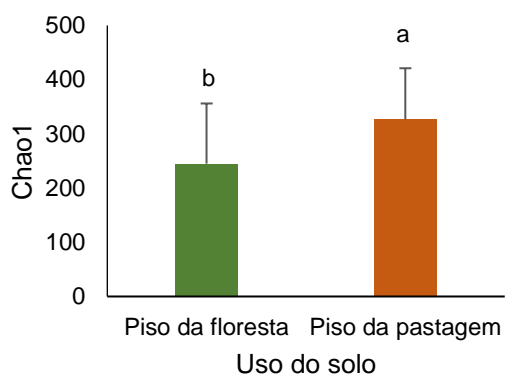
C



D



E



F

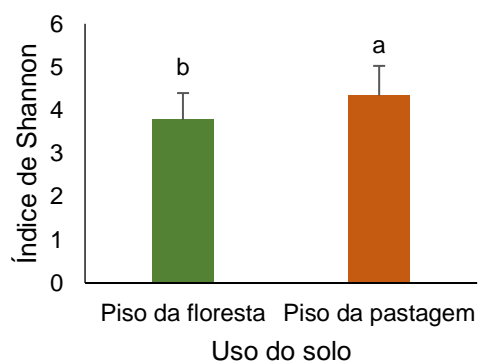
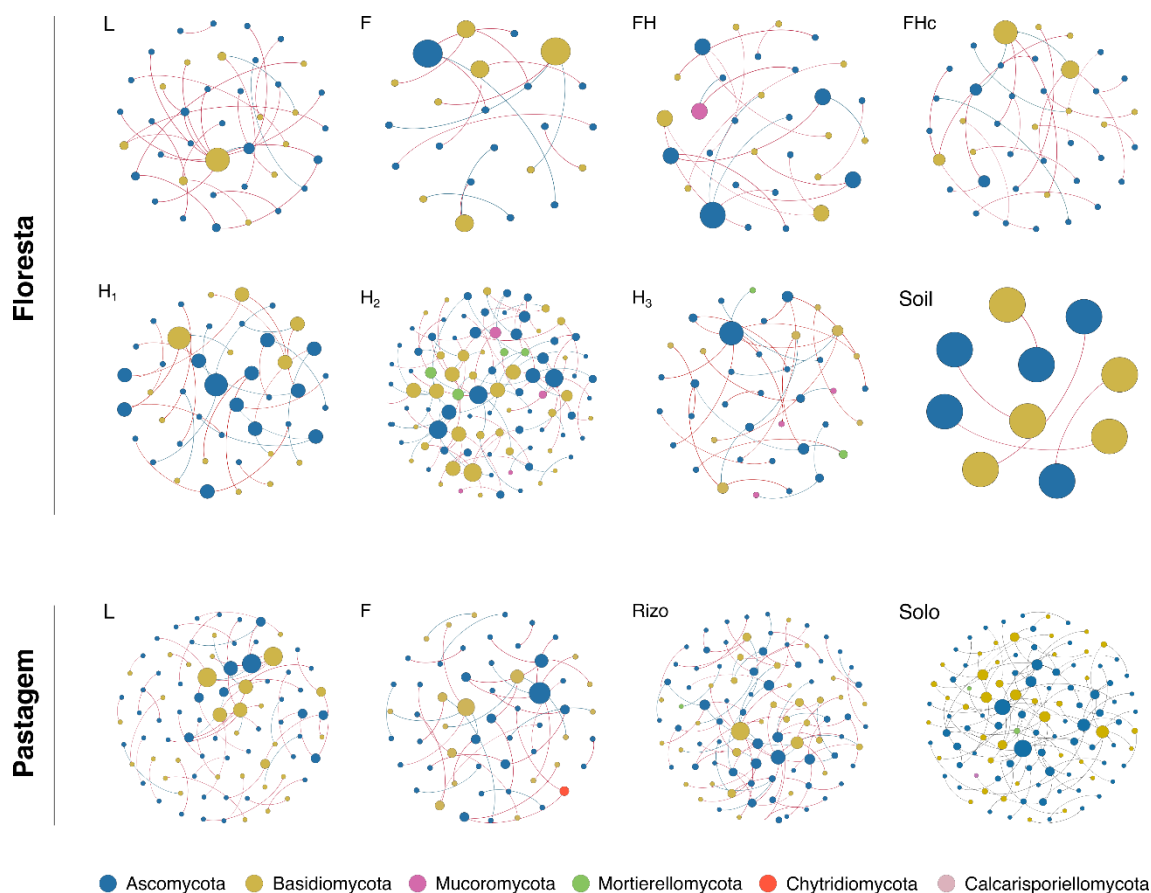


Figura 6 – Redes de correlação das camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e do solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; FHc, húmus com raízes finas; H₁, húmus; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



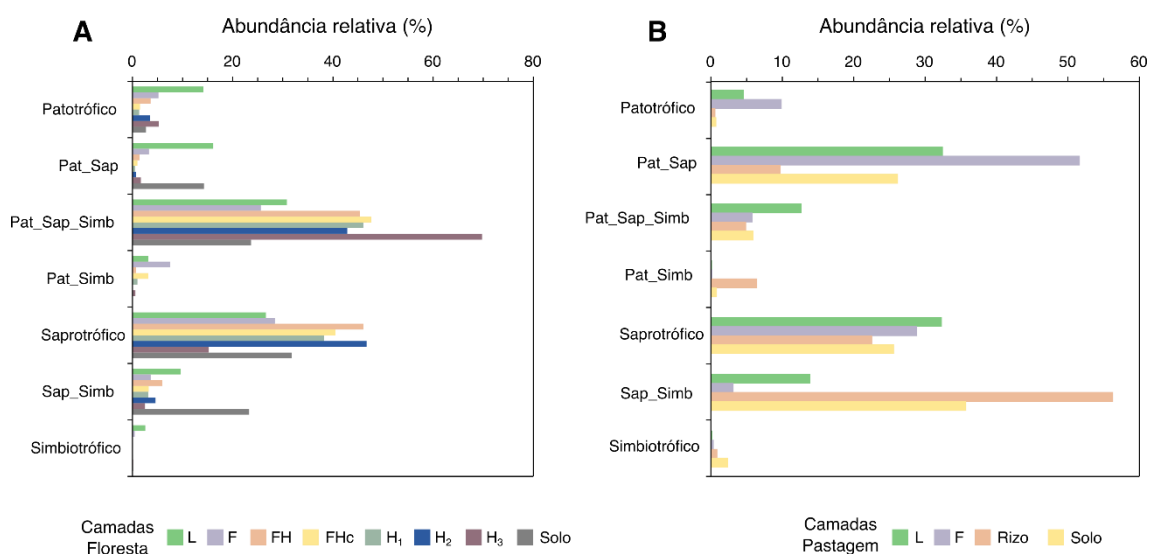
3.6 Grupos funcionais

As comunidades de fungos de cada camada orgânica do solo mineral de ambos os sistemas foram classificadas pelo seu modo trófico (Figura 7) e informações das principais guildas ecológicas (Apêndices H, I). A classificação dos modos tróficos foi relacionada aos dados de abundância relativa dos gêneros classificados.

Os modos tróficos saprotrófico-simbiotrófico e saprotrófico apresentaram as maiores abundâncias relativas na floresta; na pastagem, os modos patotrófico-saprotrófico, saprotrófico e saprotrófico - simbiotrófico foram os mais abundantes. Ao se comparar as camadas dentro de cada sistema, vê-se que na floresta, os saprotróficos foram mais abundantes nas camadas orgânicas e os saprotróficos-simbiotróficos no solo

mineral. A abundância dos saprotrófico e patotrófico-saprotrófico-simbiotrófico aumentou com a profundidade, se tornando máxima na camada H3, o que indica uma maior afinidade por camadas com matéria orgânica em estado mais avançado de decomposição. Na pastagem, o modo saprotrófico-simbiotrófico predominou no solo se comparado à serapilheira. Por sua vez, o patotrófico-saprotrófico foi mais abundante na serapilheira em comparação ao solo.

Figura 7 – Abundância relativa de modos tróficos de fungos nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e pastagem.



4 DISCUSSÃO

Este estudo forneceu novas percepções a respeito da contribuição do compartimento orgânico do solo na diversidade de fungos em solos tropicais e de como esse compartimento é importante para estudar os efeitos da mudança de uso do solo na comunidade fúngica.

As camadas orgânicas e o solo mineral abrigaram distintas comunidades fúngicas tanto na floresta quanto na pastagem. Além disso, as comunidades também foram diferentes entre os dois sistemas de uso do solo. Os fungos participam da decomposição da serapilheira e de seus subprodutos e, portanto, a qualidade do material orgânico nas diferentes fases desse processo afeta a estrutura das comunidades do horizonte orgânico (ASPLUND et al., 2019; HABTEWOLD et al., 2020; MCGUIRE et al., 2012), mas não necessariamente as comunidades do solo mineral subjacente (PRESCOTT; GRAYSTON, 2013; RITTER et al., 2018). Na floresta, observou-se uma sobreposição de comunidades que se diferenciaram gradualmente em direção ao solo mineral, onde, no geral, comunidades nas camadas de folhas (inteiras e fragmentadas) foram diferentes das comunidades das camadas de raiz e húmus que, por sua vez, se diferenciaram da comunidade do solo mineral. Na pastagem, o mesmo foi observado entre as camadas de folhas, porém o solo mineral e rizosfera formaram uma única comunidade. Essa estruturação sugere uma certa especificidade das comunidades de fungos com as camadas do solo, e isso pode ser particularmente importante para a preservação da floresta.

Junto às diferenciações das comunidades, alguns estudos verificaram que a riqueza e diversidade de fungos diminuía da serapilheira em direção ao solo mineral em florestas (ASPLUND et al., 2019; LUO et al., 2021). Em sistemas agrícolas esse tipo de investigação é menos frequente e geralmente as comunidades do solo são contrastadas apenas com a rizosfera (ZHANG et al., 2017; ESSEL et al., 2019). Mesmo com as evidências de que as camadas orgânicas abrigam elevada diversidade fúngica na floresta, estudos de diversidade de microrganismos do solo geralmente negligenciam essas camadas nas análises (por exemplo, MULLER et al., 2014), provavelmente subestimando os resultados encontrados, principalmente em ambientes tão dependentes do horizonte orgânico como algumas florestas da Bacia Amazônica (HERRERA et al., 1978).

A diversidade alfa no solo mineral foi maior na pastagem, o que está de acordo com Cerqueira et al. (2018). Ao contrário do que se esperava, mesmo incluindo as camadas orgânicas nas avaliações, a diversidade alfa seguiu maior na pastagem.

Entretanto, a adição das camadas orgânicas elevou substancialmente os valores de riqueza de ASVs na partição da diversidade alfa tanto da floresta, quanto da pastagem, confirmando parcialmente as hipóteses desse estudo. De fato, a contribuição na riqueza de ASVs do piso da floresta foi impulsionada principalmente pelo conjunto de camadas FH e H, região rica em raízes finas que desempenham o importante papel de conservação de nutrientes na Amazônia (HERRERA et al., 1978)). Além da serapilheira, a renovação de raízes finas e seus exsudados também representam uma importante entrada de C no solo (PHILIPPOT et al., 2013). Além da serapilheira, a renovação de raízes finas floresta, em geral, foram encontradas elevadas abundâncias relativas de gêneros classificados como saprotróficos e patotróficos-saprotróficos-simbiotróficos, principalmente entre as camadas FH e H₃. Essas camadas foram dominadas por *Trechispora* (saprotróficos) e *Trichoderma* (patotróficos-saprotróficos-simbiotróficos), que juntos, representaram mais de 50% da abundância relativa das camadas FH a H₃. Além de saprotróficas, espécies de *Trechispora* já foram sugeridas como biotróficas e possivelmente ectomicorrízicas (VANEGAS-LEÓN et al., 2019). *Trichoderma* é considerado um colonizador tardio com tendência de aumentar sua abundância durante a decomposição (OSONO et al., 2006), mas algumas de suas espécies tem um papel importante no controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento das plantas (STEWART; HILL. 2014). Entretanto, é preciso ter cautela ao interpretar esses resultados, pois Baldrian et al., (2012), através de análise de RNA, observaram que taxas fúngicas altamente ativos no horizonte orgânico do solo apresentaram baixa abundância ou mesmo ausência no “pool” de DNA. As comunidades da filosfera também podem ter contribuído para o aumento da riqueza de ASVs na diversidade alfa do piso da floresta, já que alguns fungos têm capacidade de alternar seu estilo de vida de endófitos para saprotróficos e participar do processo de decomposição (SELOSSE et al., 2018). O gênero *Cladosporium*, por exemplo, apresentou abundância relativa de 27% e 14%, respectivamente, nas camadas L e F da floresta. Esse gênero tem sido frequentemente isolado da filosfera de diferentes plantas e é considerado um colonizador precoce, com alta abundância inicial, mas que diminui durante a decomposição (OSONO et al., 2006; SADAKA; PONGE, 2003; VORISKOVA; BALDRIAN, 2013). Na pastagem, provavelmente a camada F foi a que mais contribuiu para os valores de riqueza de ASVs da diversidade alfa do piso da pastagem, surpreendentemente apresentando valor superior ao da rizosfera, uma região considerada de alta atividade e diversidade microbiana (KUZUYAKOV et al., 2015).

Aproximadamente, 50% da abundância relativa de gêneros da camada F da pastagem foi composta por fungos patotróficos-saprotroóficos. Apesar dos modos tróficos não terem sido comparados entre os sistemas de usos da terra, a elevada abundância de patotróficos-saprotroóficos não foi observada na floresta (abundância máxima de 16% na camada L da floresta), sugerindo um possível aumento relativo de patógenos facultativos na pastagem, o que já foi observado em outros estudos, inclusive na amazônia (CERQUEIRA et al., 2018; SHI et al., 2019). Fungos do filo Glomeromycota, que seriam importantes colonizadores das camadas de raízes, foram subestimados no conjunto de dados devido ao uso do biomarcador ITS, considerado subótimo para FMA (SCHOCH et al., 2012), e por isso, uma insignificante abundância de gêneros foi classificada como simbiotróficos em ambos os usos do solo.

A contribuição das camadas orgânicas também foi verificada para outras escalas de diversidade (beta e gama). Analisando a diversidade beta apenas do solo mineral, observou-se um aumento da riqueza de ASVs ($q = 0$) e diversidade de Shannon ($q = 1$) na pastagem, mas, com a adição das camadas orgânicas, esses valores no piso da floresta tornaram-se maiores aos do piso da pastagem, que foi influenciado negativamente pela camada F e rizosfera (PROBER et al., 2015; ZINGER et al., 2011). Cerqueira et al. (2018) sugeriram uma tendência de homogeneização biótica de fungos em pastagens na Amazônia ao observarem menor dissimilaridade entre as comunidades da pastagem em relação às da floresta. Dois estudos importantes sobre diversidade beta da comunidade bacteriana na Amazônia revelaram resultados contrastantes, onde Rodrigues et al., 2013 encontraram diminuição da diversidade beta na pastagem, enquanto Carvalho et al. (2016) observaram aumento na pastagem e também em uma área de agricultura mecanizada. Apesar das comunidades de bactérias e fungos responderem de forma diferente às variáveis bióticas e abióticas do solo como um todo (HE et al., 2017; HABTEWOLD et al., 2020) o fato é que nenhum desses estudos incluíram as camadas orgânicas e não se pode afirmar até que ponto esse compartimento afetaria os resultados. Entretanto, recentemente em um estudo semelhante ao presente trabalho, Rocha et al. (2021) observaram que as diversidades beta e gama de procariotos foram geralmente maiores nas florestas quando as camadas de serapilheira e raízes eram consideradas. Esses achados, juntamente com os resultados deste estudo, reforçam a contribuição das camadas orgânicas para o *turnover* das comunidades microbianas da floresta e a necessidade de se incluir o compartimento orgânico em estudos de diversidade.

Redes de co-ocorrência individuais para cada camada da floresta e da pastagem foram criadas para avaliar a complexidade das interações fúngicas. As redes revelaram que as interações na pastagem são mais complexas do que na floresta. Um resultado interessante foi que, as redes das camadas orgânicas da floresta eram muito mais complexas do que a do solo mineral, ao contrário da pastagem, que revelou redes mais complexas no solo mineral e na rizosfera. Além disso, as interações de todas as redes foram majoritariamente negativas, o que pode estar sugerindo uma elevada competição entre os taxos. Mundra et al. (2021) encontraram um forte particionamento de nicho com a profundidade do solo, refletindo na diversidade de comunidades bacterianas e na complexidade de interações inter-reinos. A análise de redes sugere que as interações bióticas na floresta, observadas em profundidade, na verdade, são um reflexo da natureza do substrato e que esse gradiente de substratos pode ser importante para os estudos de comunidades microbianas. Por exemplo, a rede da camada H₂ destacou-se, sendo a mais complexa da floresta. Cabe ressaltar que essa pode ser uma importante região do horizonte orgânico, visto que grande parte de suas ASVs não puderam ser classificadas ao nível de gênero, sugerindo limitação do banco de dados e/ou presença de novas espécies.

5 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que as camadas orgânicas do solo são um importante reservatório de diversidade fúngica na floresta e que a conversão da floresta à pastagem leva a um aumento expressivo da diversidade no solo mineral e rizosférico. As camadas orgânicas incrementaram substancialmente os valores de riqueza de ASV, permitindo detectar diferenças de beta e diversidade gama em relação à pastagem, apesar da diversidade alfa seguir maior na pastagem. Sugere-se que a diversidade de outros grupos microbianos também seja investigada utilizando essa abordagem.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K. *et al.* **The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives.** *New Phytologist*, v. 186, n. 2, p. 281-285, 2010.
- ANDERSON, M.J. **A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.** *Austral Ecology*, v. 26, p. 32–46, 2001.
- ASPLUND, J. *et al.* **Spruce and beech as local determinants of forest fungal community structure in litter, humus and mineral soil.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 95, n. 2, p. 232, 2019.
- BALDRIAN, P. *et al.* **Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition.** *The ISME Journal*, v. 6, n. 2, p. 248–258, 2012.
- CALLAHAN, B. J. *et al.* **DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature Methods*, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- CERQUEIRA, A. E. S. *et al.* **Amazon basin pasture soils reveal susceptibility to phytopathogens and lower fungal community dissimilarity than forest.** *Applied Soil Ecology*, v. 131, p. 1–11, 2018.
- CARVALHO, T. S. *et al.* **Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria.** *Ecology*, v. 97, n. 10, p. 2760–2771, 2016.
- CHAO, A.; CHIU, C.H.; JOST, L. **Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 45, p. 297–324, 2014.
- ESSEL, E. *et al.* **Bacterial and fungal diversity in rhizosphere and bulk soil under different long-term tillage and cereal/legume rotation.** *Soil and Tillage Research*, v. 194, p. 104302, 2019.
- FRACETTO, *et al.* **Impact of amazon land use on the community of soil fungi.** *Scientia Agricola*, v. 70, n. 2, p. 59–67, 2013.
- HABTEWOLD, J. Z. *et al.* **Litter composition has stronger influence on the structure of soil fungal than bacterial communities.** *European Journal of Soil Biology*, v. 98, p. 103190, 2020.
- HE, D. *et al.* **Diversity and co-occurrence network of soil fungi are more responsive than those of bacteria to shifts in precipitation seasonality in a subtropical forest.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 115, p. 499–510, 2017.

HERRERA, R.; KLINGE, H.; MEDINA, E. **Amazon ecosystems: their structure and functioning with particular emphasis on nutrients.** *Interciencia*, v. 3, n. 4, p. 223–231, 1978

JESUS, E.D. et al. **Changes in land use alter the structure of bacterial communities in western Amazon soils.** *The ISME Journal*, v. 3, p. 1004-1011, 2009.

JOST, L. (2006) **Entropy and diversity.** *Oikos*, v. 113, p. 363–375, 2006.

KROEGER, M. E. *et al.* **New biological insights into how deforestation in Amazon affects soil microbial communities using metagenomics and metagenome-assembled genomes.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1635, 2018.

KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. **Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 83, p. 184–199, 2015.

LEMOS, L. N. *et al.* **Amazon deforestation enriches antibiotic resistance genes.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 153, p. 108110, 2021.

LINDAHL, B. D. *et al.* **Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest.** *New Phytologist*, v. 173, n. 3, p. 611–620, 2007.

LIU, C.; CUI, Y.; LI, X.; YAO, M. **Microeco: An R package for data mining in microbial community ecology.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 2, 2021.

LUO, X. *et al.* **Fungal community composition and diversity vary with soil horizons in a subtropical forest.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 650440, 2021.

MAIA, L. C. *et al.* **Species diversity of Glomeromycota in Brazilian biomes.** *Sydowia*, v. 72, 2020.

MARCON, E.; HÉRAULT, B. **entropart: An R Package to Measure and Partition Diversity.** *Journal of Statistical Software*, v. 67, n. 1, p. 1–26, 2015.

MCGUIRE, K. L. *et al.* **Fungal Community Composition in Neotropical Rain Forests: The Influence of Tree Diversity and Precipitation.** *Microbial Ecology*, v. 63, n. 4, p. 804–812, 2012.

MUELLER, R. C.; *et al.* **Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest.** *The ISME Journal*, v. 8, n. 7, p. 1548–1550, 2014.

MUELLER, R. C. *et al.* **Land use change in the Amazon rain forest favours generalist fungi.** *Functional Ecology*, v. 30, n. 11, p. 1845–1853, 2016.

MUNDRA, S. *et al.* **Soil depth matters: shift in composition and inter-kingdom co-occurrence patterns of microorganisms in forest soils.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 3, p. fiab022, 2021.

- NAVARRETE, A. A. *et al.* **Land-use systems affect archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soil.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 1527-1540, 2011.
- NGUYEN, N. H. *et al.* **FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild.** *Fungal Ecology*, v. 20, p. 241–248, 2016.
- OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: community ecology package.** R Package, 2020.
- OSONO, T.; HIROSE, D.; FUJIMAKI, R. **Fungal colonization as affected by litter depth and decomposition stage of needle litter.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 9, p. 2743–2752, 2006.
- PAPA, S. *et al.* **Microbial enzyme activities, fungal biomass and quality of the litter and upper soil layer in a beech forest of south Italy.** *European Journal of Soil Science*, v. 65, n. 2, p. 274–285, 2014.
- PAULA, F.S. *et al.* **Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities.** *Molecular Ecology*, v. 23, p. 2988–2999, 2014.
- PHILIPPOT, L. *et al.* **Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 789-799, 2013.
- PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. **Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs.** *Forest Ecology and Management*, v. 309, p. 19–27, 2013.
- PROBER, S. M. *et al.* **Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide.** *Ecology Letters*, v. 18, n. 1, p. 85–95, 2015.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021.
- RITTER, C. D. *et al.* **Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity.** *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 14, p. 7509–7524, 2020.
- RITTER, C. D. *et al.* **High-throughput metabarcoding reveals the effect of physicochemical soil properties on soil and litter biodiversity and community turnover across Amazonia.** *PeerJ*, v. 2018, n. 9, 2018.
- ROCHA, F. I. *et al.* **Land-use system and forest floor explain prokaryotic metacommunity structuring and spatial turnover in Amazonian forest-to-pasture conversion areas.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.
- RODRIGUES, J. L. M. *et al.* **Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities.** *PNAS*, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

ROSLING, A. *et al.* **Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile.** *New Phytologist*, v. 159, n. 3, p. 775–783, 2003.

SADAKA, N.; PONGE, J. F. **Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco).** *Biology and Fertility of Soils*, v. 39, n. 1, p. 30–36, 2003.

SCHOCH, C. L. *et al.* **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** *PNAS*, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SELOSSE, M. A.; SCHNEIDER-MAUNOURY, L.; MARTOS, F. **Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged.** *New Phytologist*, v. 217, p. 968-972, 2018.

SHI, L. *et al.* **Changes in fungal communities across a forest disturbance gradient.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 12, 2019.

STEWART, A.; HILL, R. **Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion.** *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, p. 415–428, 2014.

THOMPSON, L. R. *et al.* **A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity.** *Nature*, v. 551, n. 7681, p. 457–463, 2017.

TIBBETT, M.; FRASER, T. D.; DUDDIGAN, S. **Identifying potential threats to soil biodiversity.** *PeerJ*, v. 8, p. e9271, 2020.

TYUKAVINA, A. *et al.* **Types and rates of forest disturbance in Brazilian Legal Amazon, 2000–2013.** *Science Advances*, v. 3, n. 4, p. e1601047, 2017.

VANEGAS-LEÓN, M. L. *et al.* **Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes?** *Mycological Progress*, v. 18, n. 9, p. 1231–1240, 2019.

VORISKOVA, J.; BALDRIAN, P. **Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes.** *The ISME Journal*, v. 7, n. 3, p. 477–486, 2013.

ZINGER, L. *et al.* **Contrasting diversity patterns of Crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape.** *PLOS ONE*, v. 6, n. 5, p. e19950, 2011.

APÊNDICE

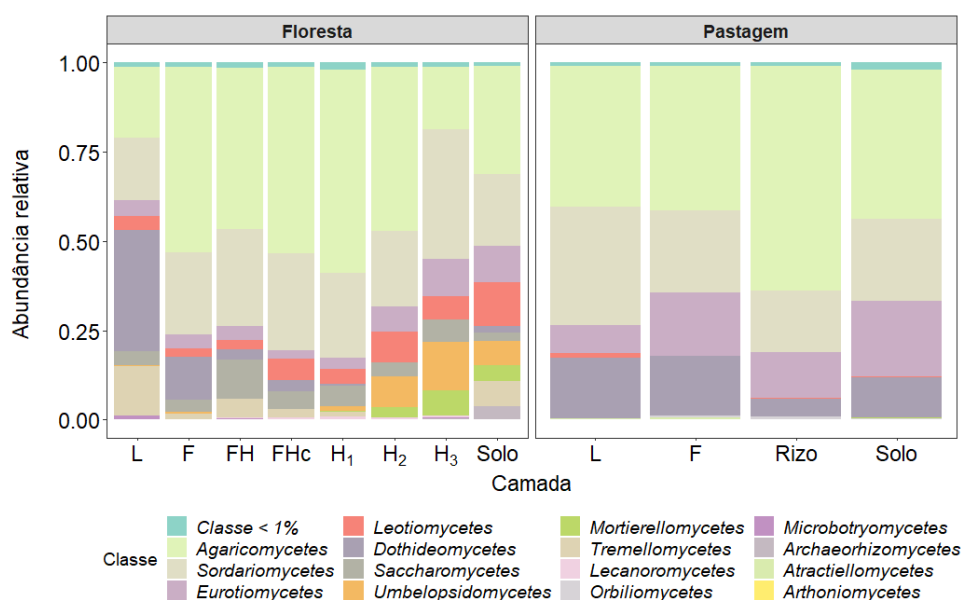
APÊNDICE A – Propriedades químicas das camadas orgânicas da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições. L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

Propriedades	Unidade	Floresta					Pastagem	
		L	F	FHc	H ₁	H ₂	L	F
N	g Kg ⁻¹	13.1 ± 2.5	16.3 ± 2.6	18.8 ± 2.9	12.8 ± 5.6	12.6 ± 2.6	7.35 ± 1.2	7.5 ± 2.3
P	g Kg ⁻¹	272.2 ± 102.3	318.8 ± 75.1	294.0 ± 67.1	156.7 ± 64.7	126.6 ± 16.2	192.4 ± 45.3	182.6 ± 37
K	mg Kg ⁻¹	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.08	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.09	0.3 ± 0.05
Ca	mg Kg ⁻¹	5325 ± 1670	4145 ± 1027	1576 ± 857	301 ± 35	273 ± 148	5195 ± 504	3840 ± 245
Mg	mg Kg ⁻¹	2054 ± 688.3	1638 ± 716	803 ± 375	282 ± 182	210 ± 148	1298 ± 504	797 ± 225
Cu	mg Kg ⁻¹	85.6 ± 93.9	4.9 ± 1.3	4.02 ± 1.3	1.5 ± 0.5	0.26 ± 0.6	5.13 ± 2.3	3.42 ± 0.9
Fe	mg Kg ⁻¹	149.2 ± 45.8	269.6 ± 47.4	398.80 ± 75.3	393.40 ± 156.5	383.40 ± 117	344.40 ± 81.8	2514.4 ± 899.9
Mn	mg Kg ⁻¹	90.3 ± 29.5	91.9 ± 37.5	60.24 ± 21.1	17.66 ± 3.9	8.91 ± 3.5	99.34 ± 26.4	94.98 ± 24
Zn	mg Kg ⁻¹	16.5 ± 2.5	19.6 ± 7.9	17.80 ± 6.2	8.29 ± 3.3	7.21 ± 2.2	28.74 ± 3.2	21.08 ± 4
13C	g Kg ⁻¹	466.37 ± 22.5	476.5 ± 20.3	478.24 ± 30.7	417.54 ± 74.1	368.67 ± 29.9	425.13 ± 12.6	247.06 ± 28
15N	g Kg ⁻¹	1.3 ± 0.3	1.64 ± 0.2	1.91 ± 0.3	1.96 ± 0.5	1.61 ± 0.3	0.73 ± 0.2	0.70 ± 0.08
C:N	-	40 ± 8	40 ± 8	25 ± 3	22 ± 4	24 ± 7	57 ± 3	35 ± 5

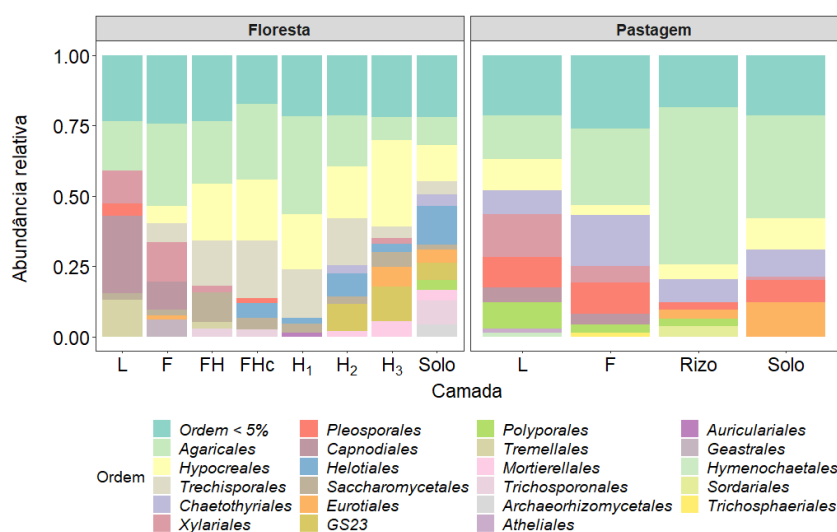
APÊNDICE B - Propriedades químicas das camadas organominerais da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições.

Propriedades	Unidade	Floresta		Pastagem	
		H ₃	Solo	Solo	Rizosfera
C org	g Kg ⁻¹	82.9 ± 18.1	15.86 ± 3.7	10.62 ± 1.3	17.98 ± 3.8
N	g Kg ⁻¹	5.6 ± 1.0	1.16 ± 0.4	0.96 ± 0.15	1.48 ± 0.3
P	mg Kg ⁻¹	7.4 ± 1.5	2.40 ± 1.5	2.60 ± 2.07	4.40 ± 0.9
Ca ²⁺	cmol Kg ⁻¹	0.8 ± 0.3	0.22 ± 0.08	1.24 ± 0.4	2.08 ± 0.6
Mg ²⁺	cmol Kg ⁻¹	1.0 ± 0.4	0.22 ± 0.005	0.54 ± 0.4	0.8 ± 0.2
K ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.16 ± 0.05	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Na ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.18 ± 0.11	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005
Cu	mg Kg ⁻¹	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.07
Fe	mg Kg ⁻¹	8.13 ± 1.3	3.96 ± 0.9	17.38 ± 4.9	22.90 ± 5.1
Mn	mg Kg ⁻¹	3.46 ± 2.8	0.34 ± 0.3	9.58 ± 2.5	4.81 ± 1.1
Zn	mg Kg ⁻¹	5.30 ± 3.4	0.72 ± 0.2	2.00 ± 0.7	0.93 ± 0.2
Al ³⁺	cmol Kg ⁻¹	3.94 ± 0.9	1.04 ± 0.4	0.01 ± 0	0
pH (H ₂ O)	-	3.82 ± 0.2	4.3 ± 0.3	5.68 ± 0.4	5.76 ± 0.2
13C	g Kg ⁻¹	13.60 ± 2.3	2.43 ± 0.5	1.26 ± 0.2	2.95 ± 0.7
15N	g Kg ⁻¹	0.67 ± 0.09	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.04
C:N	-	20 ± 1	21 ± 6	15 ± 0.4	16 ± 1

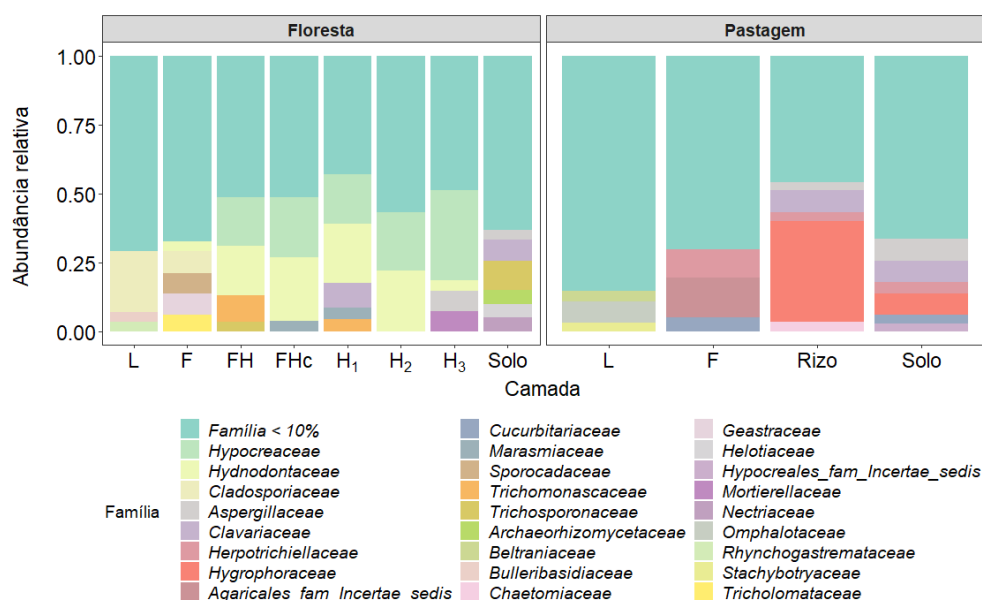
APÊNDICE C – Abundância relativa de classes fúngicas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



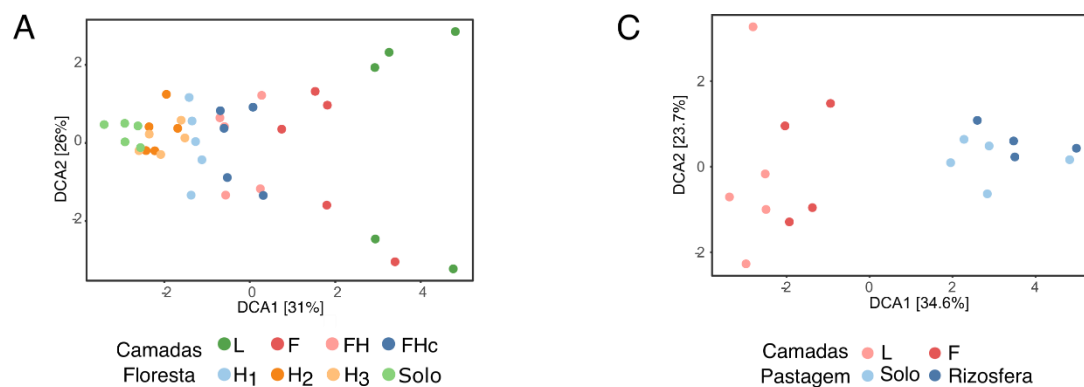
APÊNDICE D – Abundância relativa de ordens fúngicas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



APÊNDICE E – Abundância relativa de famílias fúngicas nas camadas orgânicas em diferentes estágios de decomposição e no solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



APÊNDICE F – Análise de correlação destendenciada (DCA) das camadas orgânicas e solo mineral das floresta (A) e da pastagem (B).



B

	Floresta			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.823	0.689	0.624	0.517
Valores Decorana	0.854	0.785	0.574	0.493
Comprimento do eixo	8.216	6.079	5.018	3.625

D

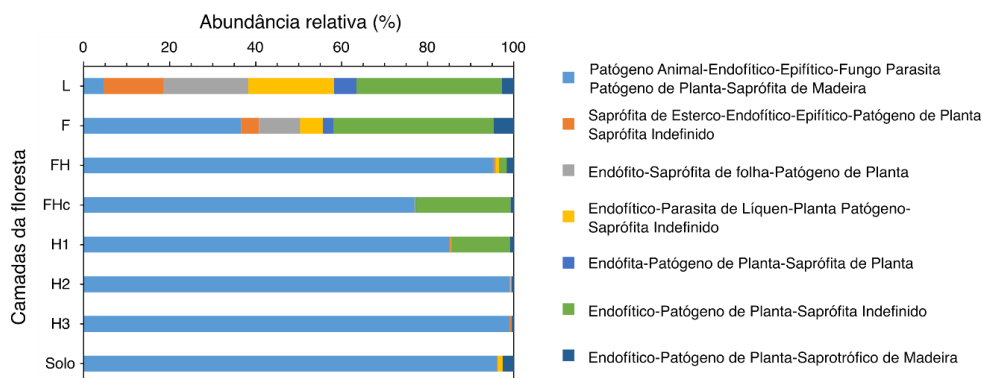
	Pastagem			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.898	0.617	0.509	0.574
Valores Decorana	0.909	0.712	0.574	0.355
Comprimento do eixo	8.362	5.539	3.832	3.859

APÊNDICE G – Atributos de redes fúngicas das camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

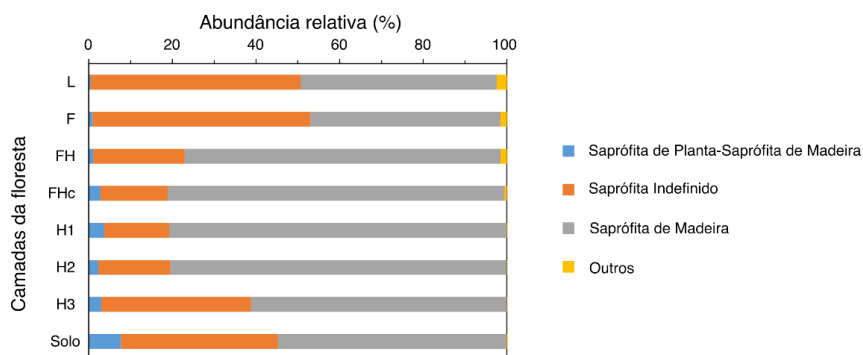
Parâmetro	Floresta								Pastagem			
	L	F	FH	FHc	H ₁	H ₂	H ₃	Solo	L	F	Rizo	Solo
Nós	40	23	31	40	44	97	40	14	84	57	95	113
Arestas	28	15	20	24	31	94	31	8	55	39	85	111
Grau médio	1.4	1.304	1.29	1.2	1.409	1.938	1.55	1.143	1.31	1.368	1.789	1.965
Diâmetro da rede	6	2	3	5	4	24	5	2	6	4	13	13
Modularidade	0.768	0.849	0.878	0.828	0.907	0.808	0.802	0.806	0.904	0.901	0.836	0.795
Comprimento médio de caminho	2.574	1.375	1.438	2.0338	1.689	9.14	2.081	1.2	2.503	1.891	4.969	6.044
Borda positivas (%)	10.7	33.3	20	16.7	38.7		32.2	0	14.5	30.7	29.4	14.4
Bordas negativas (%)	89.3	66.7	80	83.3	61.3		67.8	100	85.5	69.3	70.6	85.6

APÊNDICE H – Classificação das guildas referentes aos principais modos tróficos da floresta.

A Patotrófico-Saprotrofico-Simbiotrófico

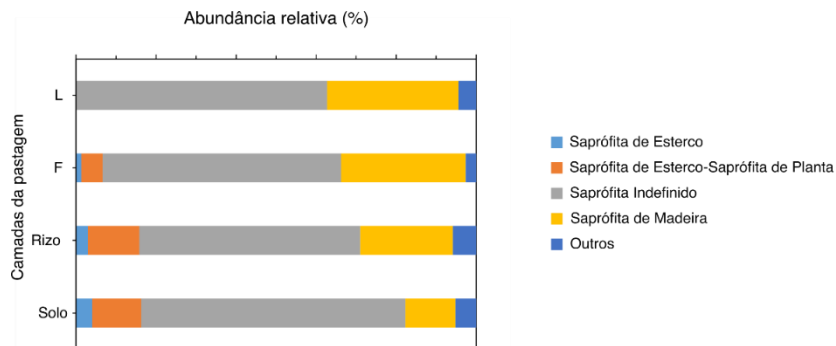


B Saprotrofico

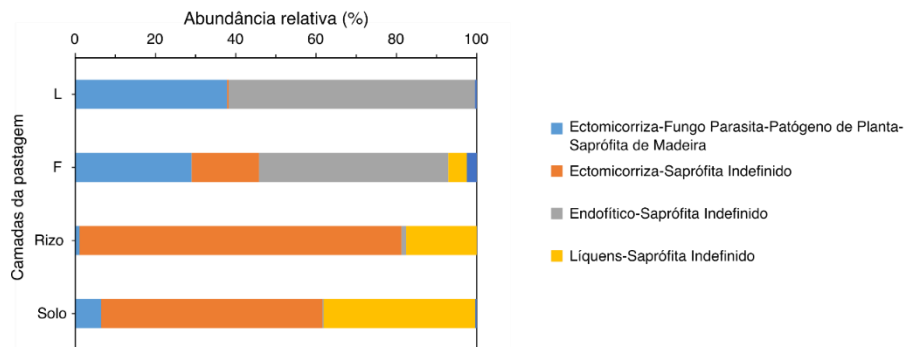


APÊNDICE I – Classificação das guildas referentes aos principais modos tróficos da pastagem.

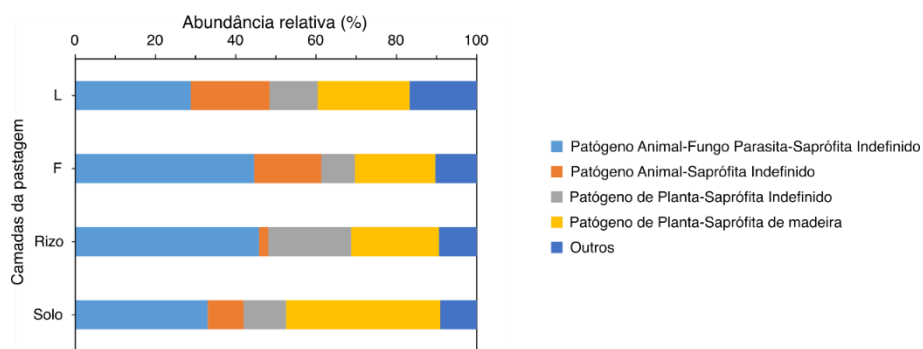
A Saprotróficos



B Saprotróficos-Simbiotróficos



C Patotróficos-Saprotróficos



CAPÍTULO 4 – A IMPORTÂNCIA DAS CAMADAS ORGÂNICAS PARA A DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA AMAZÔNIA ORIENTAL

RESUMO

Florestas tropicais sobre solos de baixa fertilidade, como a Amazônica, são dependentes da ciclagem de nutrientes das camadas orgânicas superficiais do solo e de associações simbióticas como a que ocorre entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Presume-se que as camadas orgânicas detenham elevada diversidade de FMA diante da sua alta concentração de raízes finas. Frequentemente essas camadas são negligenciadas nos estudos de diversidade microbiana e, portanto, este estudo avaliou sua contribuição para a diversidade de FMA do solo florestal, e como a conversão floresta-pastagem pode afetar a composição e diversidade desses fungos. Foram amostradas camadas em diferentes estágios de decomposição, a porção superior do solo mineral da floresta e pastagem e o solo rizosférico da pastagem. Foi realizado o sequenciamento do gene 18S rRNA pela plataforma Illumina para identificar as comunidades de FMA. A estrutura das comunidades foi avaliada e índices de diversidade foram comparados entre floresta e pastagem. Os resultados mostraram que, embora a inclusão das camadas orgânicas tenha incrementado os valores de diversidade alfa, a conversão floresta-pastagem não alterou a diversidade alfa de FMA. Diversidade beta foi maior para o piso da floresta apenas na riqueza de ASVs e verificou-se que a exclusão das camadas orgânicas pode superestimar os valores dessa escala de diversidade. A conversão modificou a estrutura das comunidades de FMA. Dentro de cada uso da terra foram observadas diferentes comunidades de FMA que mudaram progressivamente em direção ao solo mineral. Na floresta, maior riqueza de FMA foi atribuída às camadas FH e H e, na pastagem, à rizosfera. Embora não se tenha dados de abundância, FMA foram detectados nas camadas de folhas frescas e em decomposição na floresta, mas também na pastagem. Em conjunto, os resultados indicam que as camadas orgânicas são um importante compartimento para a diversidade de FMA do solo e podem auxiliar na melhor compreensão da ecologia desses fungos.

Palavras-chave: 18S rRNA, micorriza, diversidade microbiana, mudança do uso do solo, serapilheira, húmus

THE IMPORTANCE OF ORGANIC LAYERS FOR THE DIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN THE WESTERN AMAZON

ABSTRACT

Tropical forests thriving on low fertility soils, such as the Amazon Forest, are dependent on nutrients recycled from the soil's surface organic layers and symbiotic associations like those established between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). It is assumed that the organic layers hold a high diversity of AMF due to their high concentration of fine roots. These layers are often neglected in microbial diversity studies and, therefore, this study evaluated their contribution to forest soil AMF diversity, and how the forest-grassland conversion can affect the composition and diversity of these fungi. Layers in different stages of decomposition, the upper portion of the mineral soil of the forest and pasture, and the rhizospheric soil of the pasture were sampled. The sequencing of the 18S rRNA gene by the Illumina platform was performed to identify the AMF communities. The structure of the communities was evaluated, and diversity indices were compared between forest and pasture. The results showed that, although the inclusion of organic layers increased the alpha diversity values, the forest-pasture conversion did not change the AMF alpha diversity. Beta diversity was higher for the forest floor only in the ASVs richness and it was found that the exclusion of organic layers can overestimate the values of this diversity scale. The conversion changed the structure of the AMF communities. Within each land use, different AMF communities were observed that moved progressively towards mineral soil. In the forest, greater AMF richness was attributed to the FH and H layers and, in the pasture, to the rhizosphere. Although abundance data are not available, AMF were detected in the fresh and decaying leaf layers in the forest, but also in the pasture. Together, the results indicate that the organic layers are an important compartment for the diversity of AMF in the soil and can help in a better understanding of the ecology of these fungi.

Keywords: 18S rRNA, mycorrhiza, microbial diversity, land use change, litter, humus.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA; Glomeromycota) são organismos biotróficos obrigatórios capazes de estabelecer simbiose mutualística com raízes da maioria das plantas conhecidas. Nessa relação, a planta direciona fotoassimilados aos fungos e, em troca, os FMA auxiliam na nutrição da planta, fornecendo nutrientes essenciais e limitados no solo, como P e N (VAN DER HEIJDEN et al., 2015).

Grande parte das florestas da bacia Amazônica desenvolveram-se sob solos ácidos e de baixa fertilidade, tornando a matéria orgânica de particular importância para seu estado de fertilidade, adsorvendo, trocando e fornecendo nutrientes (HERRERA et al., 1987b). Como forma de conservação desses nutrientes, a floresta concentra raízes finas na camada orgânica superficial do solo (HERRERA et al., 1987). Juntamente com essas raízes, os FMA também são relevantes na aquisição de nutrientes (HERRERA et al., 1987a; SIQUEIRA; SAGGIN-JÚNIOR, 2001), já sendo observada sua maior eficiência em colonizar raízes da camada orgânica do aquelas do solo mineral (SHELDRAKE et al., 2017). Além disso, os FMA parecem ter um papel na ciclagem de nutrientes, já que são frequentemente encontrados colonizando a camada de folhas em decomposição (camada F) do horizonte orgânico do solo (ARISTIZÁBAL; RIVERA; JANOS, 2003; BUNN et al., 2019; CAMENZIND; RILLIG, 2013; DÍAZ-ARIZA; RIVERA; SÁNCHEZ, 2021).

Embora os FMA apresentem elevada capacidade de explorar o solo, através do crescimento do micélio extrarradicular, e da íntima relação com o compartimento orgânico do solo, existem poucas informações de sua distribuição nas camadas orgânicas de solos tropicais e de como as comunidades associadas a essas camadas contribuem para a diversidade de FMA do solo como um todo. Estudos em regiões de clima temperado e boreal mostram que fungos ectomicorrízicos são mais abundantes em regiões com material orgânico parcialmente decomposto, húmus e na porção superior do solo mineral (LINDAHL et al., 2007; MUNDRA et al., 2021b). Além da influência da qualidade do substrato, relações competitivas entre saprófitos e micorrizas também parecem explicar a separação dessas comunidades no solo (BÖDEKER et al., 2016; LINDAHL et al., 2007). Embora essas regiões sejam dominadas por ectomicorrizas, é provável que comunidades de FMA também sejam estratificadas nos solos tropicais. Recentemente, Bunn et al. (2019) levantaram questionamentos importantes de o porquê FMA colonizam a

serapilheira e sugerem que as poucas investigações realizadas a respeito podem ocultar a verdadeira importância desse grupo em ecossistemas florestais.

A floresta amazônica possui uma alta e incompreendida diversidade de fungos (RITTER et al., 2020). Cerca de 50% de todo o registro da diversidade de Glomeromycota para o Brasil foi encontrado na Amazônia (97 espécies), apesar dos poucos levantamentos realizados nessa região (MAIA et al., 2020). O crescente desmatamento da Amazônia tem colocado em risco sua biodiversidade e seus serviços ecossistêmicos, sendo a conversão da floresta para áreas agrícolas uma das maiores ameaças a esse ecossistema. Um número limitado de estudos na Amazônia mostraram que a mudança do uso do solo altera a composição das comunidades de FMA, embora mudanças na riqueza e diversidade pareçam depender do uso do solo (LEAL et al., 2013; LEAL et al., 2009; STÜRMER; SIQUEIRA, 2011). Ritter et al. (2020) observaram que as fitofisionomias da Amazônia moldam as comunidades de fungos do solo, o que provavelmente se estende aos FMA. Apesar de apresentar especificidade de hospedeiro limitada, a comunidade de FMA pode ser afetada pela comunidade de plantas (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2015), assim como pelas propriedades químicas (ZHANG et al., 2020) e manejo do solo (PEREIRA et al., 2018), relevo (POSADA et al., 2008) e sazonalidade (STÜRMER; SIQUEIRA, 2011). Além disso, as complexas interações bióticas no solo devem ser consideradas (RITTER et al., 2021). Diante de tantos fatores que podem influenciar as comunidades de FMA, espera-se, portanto, que sua estrutura seja heterogênea ao longo dos diferentes substratos do solo.

Apesar das técnicas de identificação morfológica de esporos de FMA serem eficientes nas investigações acerca da diversidade desses microrganismos do solo (LEAL et al., 2018), este estudo utilizou o sequenciamento do gene 18S rRNA para avaliar a composição de FMA em diferentes camadas orgânicas do solo de floresta e pastagem e avaliar como essas camadas contribuem para a diversidade de FMA do solo e quais os impactos da mudança do uso da terra para esse grupo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo e amostragem

O estudo foi realizado no distrito de São Joaquim do Itaquara, PA, Brasil. De acordo com a Classificação Brasileira de Solos, o solo da floresta foi classificado como Espodosolo e, na pastagem, como Latossolo. O clima da região é classificado como tropical de monções (Am – Classificação de Köppen), com temperatura média de 26.3°C e pluviosidade média anual de 2.202 mm.

Nos perfis da floresta e pastagem, foram considerados para as análises os horizontes orgânicos e os primeiros 10 cm do horizonte organomineral A. Na pastagem, também considerou-se o solo rizosférico. Na floresta, o horizonte orgânico era constituído pela serapilheira, subdivida em camadas L (folhas inteiras) e F (folhas fragmentadas indicando estágio inicial de decomposição (também conhecida como camada de fermentação) e pela camada H, de húmus, subdividida em camadas H₁ (elevada concentração de raízes finas e menor quantidade de húmus), H₂ (elevada concentração de húmus e menor quantidade de raízes finas) e H₃ (transição do horizonte orgânico para o mineral, composta por húmus misturado ao material mineral do horizonte A). Entre as camadas F e H₁, foi considerada uma camada de transição, denominada FH, subdividida em FH (material fino < 2mm) e FHc (material grosseiro > 2mm – raízes e folhas em estágio inicial de decomposição). Na pastagem, o horizonte orgânico era composto apenas pelas camadas L e F.

Foi delimitado um transecto de 250 m em cada área, com cinco pontos de coleta igualmente espaçados em 50 m. A distância entre o último ponto de coleta da floresta e o primeiro ponto da pastagem foi de 100 m. Em cada ponto, com auxílio de gabarito metálico de 25 x 25 cm, foram coletadas amostras compostas, formadas por três subamostras, de camadas orgânicas e solo mineral. A forma de distinção e coleta do material foi baseada em trabalhos de classificação de formas de húmus e no exame visual do material amostrado (TOUTAIN, 1981; PONGE ET AL., 2003). Após a coleta, as amostras foram peneiradas em malha de 2 mm (exceto L e F das duas áreas) e, posteriormente, armazenadas a -80°C. Dessa forma, foram coletas cinco repetições de oito camadas (incluindo o solo mineral) advindas da floresta e quatro camadas da pastagem (incluindo solo mineral e rizosférico), totalizando 60 amostras.

2.2 Extração de DNA e sequenciamento do gene 18S rRNA

A extração de DNA foi realizada com o DNeasy Power Soil kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 0,25 g de amostras maceradas (F, L e FHc) e 0,50 g das demais. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) observando sua pureza pela relação A260/280 e sua integridade por eletroforese em gel de agarose a 1% (100 V por 30 min), corado em brometo de etídio, com visualização das bandas em fotodocumentador.

Foi realizado o sequenciamento do amplicon 18S rRNA por meio da plataforma Illumina MiSeq (2 × 250 pb paired-end), utilizando os primers NS31/AML2 (MORGAN; EGERTON-WARBURTON, 2017) pelo *Institute for Genomics and Systems Biology Next Generation Sequencing* (IGSB-NGS) do Laboratório Nacional de Argonne (Chicago, EUA). Com base na qualidade das sequências, utilizou-se apenas o sentido forward para as análises na pipeline DADA2 (CALLAHAN et al., 2016b) incorporada ao software R (R CORE TEAM, 2021). O banco de dados MaarjAM (ÖPIK et al., 2010) foi utilizado para atribuir taxonomia às sequências. Sequências não fúngicas ou não pertencentes a FMA foram removidas.

2.3 Análise de dados e estatística

As análises de dados e estatística foram realizadas no software R, utilizando os pacotes *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013), *vegan* (OKSANEN et al., 2020) e *agricolae* (MENDIBURU; YASEEN, 2020). Com base na abundância relativa, a composição taxonômica do nível de classe ao nível de gênero foi calculada. A abundância dos principais gêneros foram comparadas dentro de cada área por meio do teste de Tukey ($p = 0.05$). Foi realizada análise de correspondência destendenciada (DCA) para avaliar o tamanho do gradiente das comunidades. Realizou-se a análise escalonamento multidimensional não-métrica (NMDS) e análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), ambas com matriz de distância de Bray-Curtis, para observar as diferenças das estruturas das comunidades dentro e entre os usos do solo.

Para os cálculos dos índices de diversidade alfa Chao1 e Shannon, foram utilizados dados rarefeitos para o menor número de leituras obtido (7033 leituras). Os índices foram calculados individualmente para cada camada da floresta, assim como da pastagem. Esses índices também foram calculados considerando o conjunto de todas as

camadas (orgânicas e mineral) de um mesmo sistema de uso, representando os valores totais de floresta (piso da floresta) e pastagem (piso da pastagem). Para comparar os valores abundância dos gêneros, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância com o método de ajuste FDR (*False Discovery Rate*).

A análise de partição de diversidade foi realizada utilizando números de Hill, pelo pacote *Entropart* (MARCON; HÉRAULT, 2015). Os números de Hill geram números efetivos de espécies igualmente frequentes para cada valor de ordem “q” em uma estrutura unificada, tornando possível a interpretação e comparação direta (CHAO et al., 2014). Foram utilizadas as ordens $q = 0$ (atribui peso igual a todas as espécies, inclusive às raras, representando a riqueza de ASVs), $q = 1$ (exponencial da entropia de Shannon, atribui às espécies peso proporcional a sua frequência, representando o número de espécies comuns da comunidade) e $q = 2$ (inverso de Simpson, representando espécies dominantes) (JOST, 2006). O particionamento de diversidade foi aplicado em todas as camadas tanto da floresta, quanto da pastagem, assim como para o piso da floresta e piso da pastagem, que consideram todas as camadas do sistema conjuntamente. Para facilitar a interpretação dos resultados, nesta análise, as camadas FH e FHc foram unidas e representadas como FH, assim como as camadas H₁, H₂ e H₃, representadas como H.

3 RESULTADOS

3.1 Propriedades químicas do solo

Os nutrientes foram analisados com diferentes metodologias nas camadas de natureza vegetal (L a H₂) e mineral (H₃, solo mineral e solo rizosférico). Portanto, deve-se tomar cuidado nas comparações das concentrações entre as camadas orgânicas e minerais.

Na floresta, a relação C:N diminuiu em profundidade, da camada L para a camada H₂, o que equivale a dizer que ela foi menor em camadas de estágio de decomposição mais avançado (Apêndice B). As concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn diminuiriam no mesmo sentido, enquanto a concentração de Fe aumentou. O P teve maior concentração na liteira e menor no horizonte orgânico (camadas H₁ e H₂). Na pastagem, as concentrações de Ca, Mg, ¹³C e a relação C:N foram maiores na camada L se comparadas à camada F.

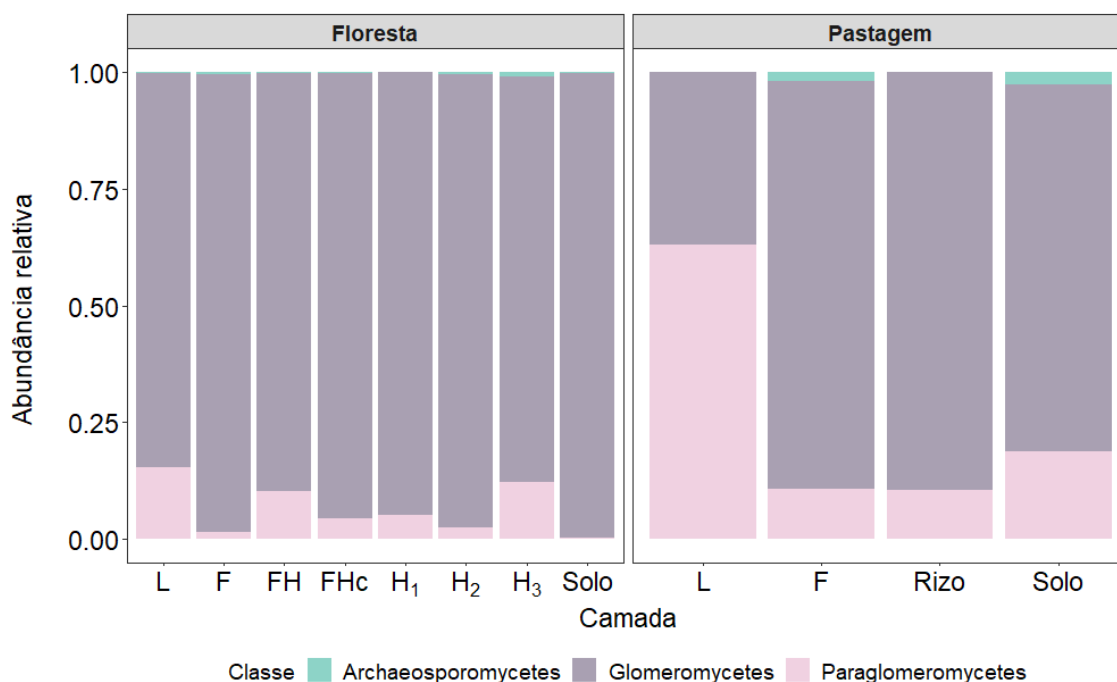
No que diz respeito aos solos (Apêndice C), ambos podem ser considerados ácidos, porém o pH foi significativamente menor no solo da floresta, com média de 4,3

contra 5,68 e 5,76 nos solos mineral e rizosférico da pastagem. O solo da pastagem apresentou maiores concentrações de Ca, Fe, Mn e Zn. Na floresta, por sua vez, foram observadas maiores concentrações de Al, ^{13}C e C orgânico.

3.2 Composição e estrutura da comunidade de FMA

Após a filtragem de quimeras, sequências não fúngicas e não pertencentes ao filo Glomeromycota, foram obtidas 1.388.031 sequências, distribuídas em 1585 ASVs e média de 24.786 sequências por camada. Na floresta, a classe Glomeromycetes foi dominante com 93.6% das sequências. Paraglomeromycetes representou 6.1% e Archaeosporomycetes, 0.3% das sequências. Na pastagem, observou-se uma menor proporção de Glomeromycetes (71.8%) e maior de Paraglomeromycetes (27%) e Archaeosporomycetes (1.2%) em relação à floresta (Figura 1).

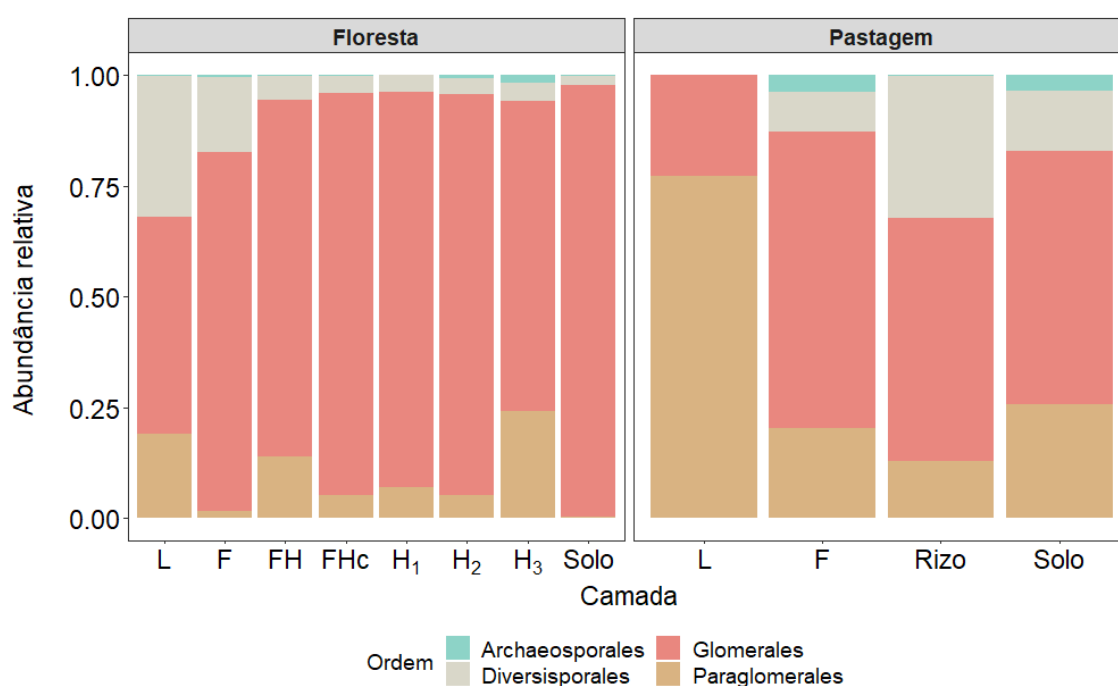
Figura 1 – Abundância relativa de classes de fungos micorrízicos arbusculares nas camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Em consequência da distribuição de classes, foram encontradas semelhanças na distribuição das ordens de FMA (Figura 2). *Glomerales* foi a ordem de abundância relativa mais elevada em todas as camadas, exceto em L da pastagem, onde predominou

Paraglomerales. Na floresta, *Diversisporales* apresentou abundância decrescente em direção ao solo mineral e, na pastagem, destacou-se na rizosfera. Foram identificadas 9 famílias de FMA (Figura 3) com predominância de *Glomeraceae* em todas as camadas, exceto em L da pastagem com *Paraglomeraceae* dominando.

Figura 2 – Abundância relativa de ordens de fungos micorrízicos arbusculares em camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

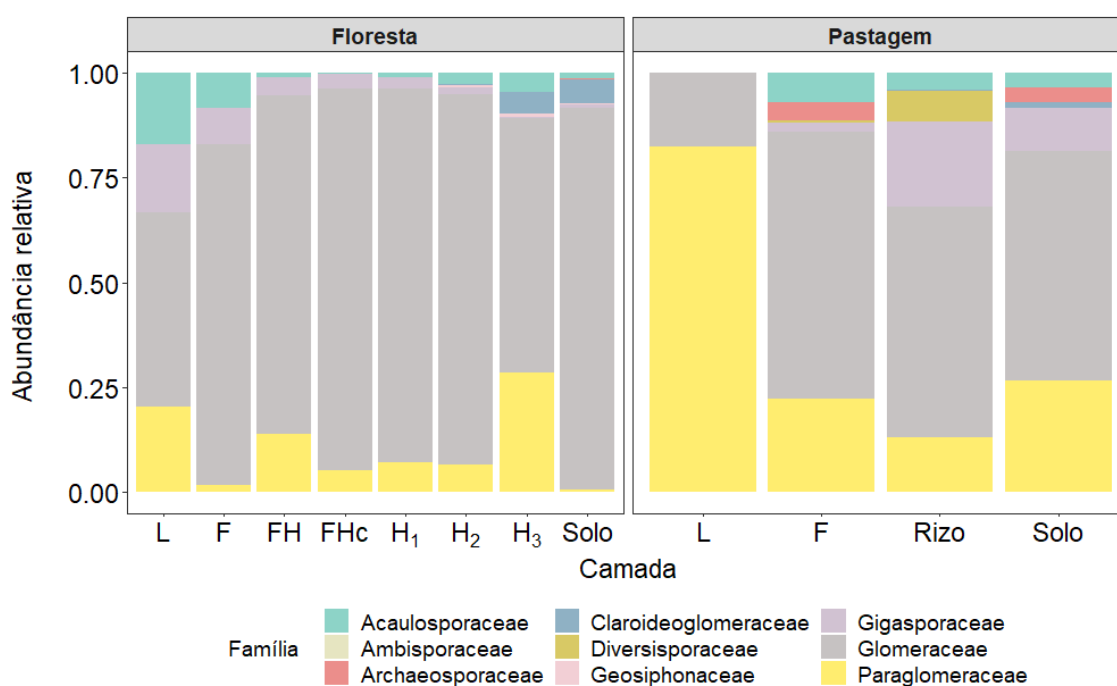


Foram identificados onze gêneros no total, mas apenas oito com abundância relativa superior a 1% em pelo menos uma camada da floresta ou pastagem (Figura 4). No geral, *Glomus* foi dominante em ambos os usos do solo, mas a conversão reduziu sua abundância em quase metade. As abundâncias relativas de *Acaulospora*, *Claroideoglomus* e *Gigaspora* também foram reduzidas com a conversão floresta-pastagem, ao contrário de *Paraglomus*, *Scutelospora* e *Archaeospora* que parecem ter sido favorecidas na pastagem. *Diversispora* só foi observada na pastagem.

Comparando os gêneros mais abundantes (Apêndice C), não foi encontrado um padrão de distribuição claro de *Glomus* na floresta, embora o gênero tenha dominado todas as camadas ($H = 17.9$; $p = 0.012$). Na pastagem, *Glomus* foi mais abundante na

camada F ($H = 11.5$; $p = 0.009$), mas também dominando grande parte das camadas, exceto L, com maior presença de *Paraglomus* ($H = 11.7$; $p = 0.008$). Na floresta, *Paraglomus* destacou-se especialmente na camada H_3 ($H = 19.3$; $p = 0.007$). Ainda na floresta, *Acaulospora* foi menos abundante nas camadas com presença de raízes e ausente no solo mineral ($H = 17$; $p = 0.004$). Não observou-se diferenças significativas na distribuição de *Scutellospora*, ausente em H_3 e também no solo mineral ($H = 5.2$; $p = 0.39$). Já na pastagem, *Acaulospora* ($H = 0.34$; $p = 0.84$) e *Scutellospora* ($H = 7.3$; $p = 0.026$) não foram detectadas em L, sendo a distribuição de *Acaulospora* semelhante entre as demais camadas e de *Scutellospora* superior na rizosfera, mas apenas em relação à camada F.

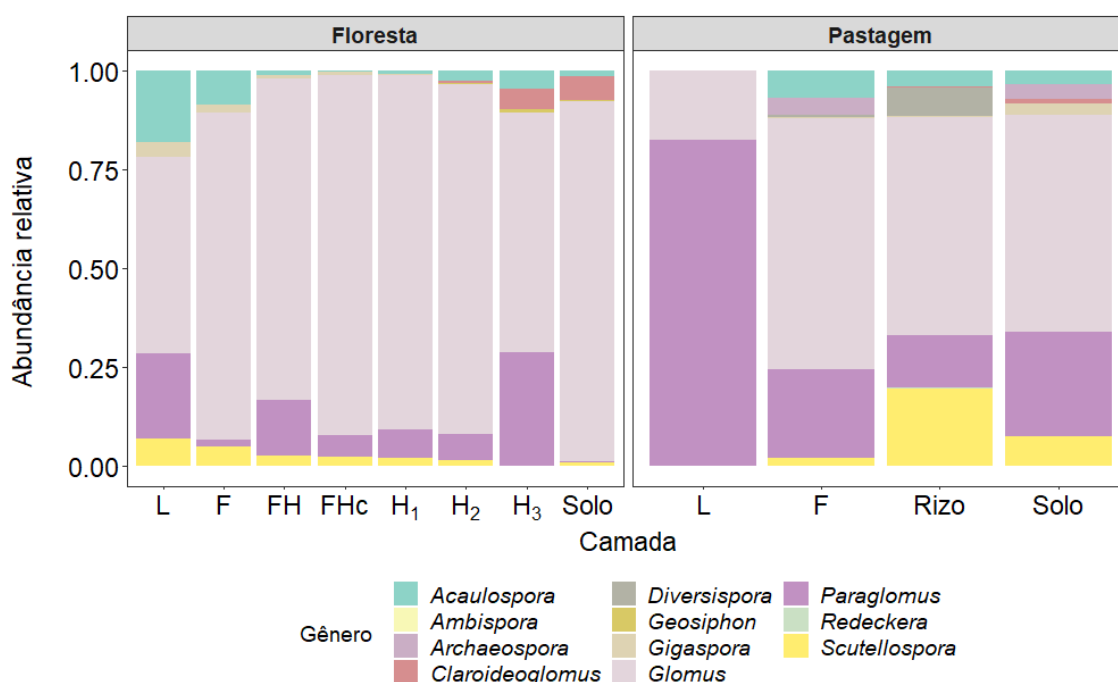
Figura 3 – Abundância relativa de famílias de fungos micorrízicos arbusculares em camadas orgânicas e solo mineral da floresta e da pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H_1 , húmus com raízes finas; H_2 , húmus; H_3 , húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Observou-se que alguns gêneros foram detectados acima de 1% em poucas camadas da floresta e ou da pastagem, a saber: *Claroideoglomerus* com, aproximadamente, 4.3% em H_3 e 4.9% no solo da floresta e 1.3% no solo da pastagem; *Gigaspora* com 4.5% e 2% em L e F da floresta, respectivamente, e 2.9% no solo da pastagem. O gênero

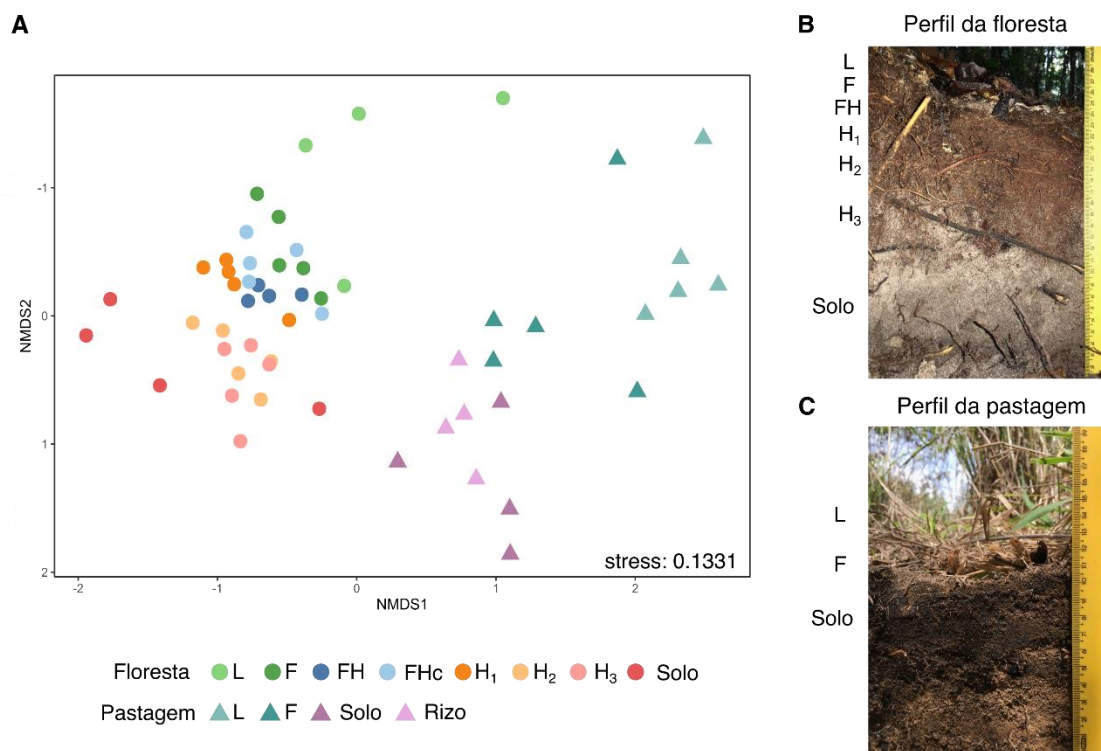
Archaeospora representou abundância insignificante na floresta (0.01%), já na pastagem (total de 1.75%) apresentou abundância de 3.9% em F e 3.3% no solo mineral. *Diversispora* não foi detectada na floresta e representou 1.75% da abundância geral da pastagem, compondo 7.4% da abundância da rizosfera.

Figura 4 – Abundância relativa de gêneros de fungos micorrízicos arbusculares nas camadas orgânicas e no solo mineral da floresta e pastagem, onde L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Na DCA (Apêndice D), foi observado um longo gradiente para floresta (6.32 standard deviations) e para pastagem (5.10 standard deviations). A NMDS (Figura 5) indicou uma diferenciação entre a composição das comunidades de FMA da floresta e da pastagem. Dentro de cada ambiente, foi visualizado um gradiente de comunidades da camada mais superficial (L) em direção ao solo mineral em ambos os usos da terra. Por meio da PERMANOVA ($F = 2.67$, $p < 0.001$), na floresta, percebeu-se a formação dos grupos L/F, F/FH/FHc/H₁, H₁/H₂, H₂/H₃ e Solo e, na pastagem, L, F/Solo e Solo/Rizo, onde camadas pertencentes ao mesmo grupo não diferiram em sua composição de FMA a 5% de significância.

Figura 5 – NMDS com matriz de distância de Bray-Curtis do conjunto de camadas orgânicas e minerais da floresta e pastagem.

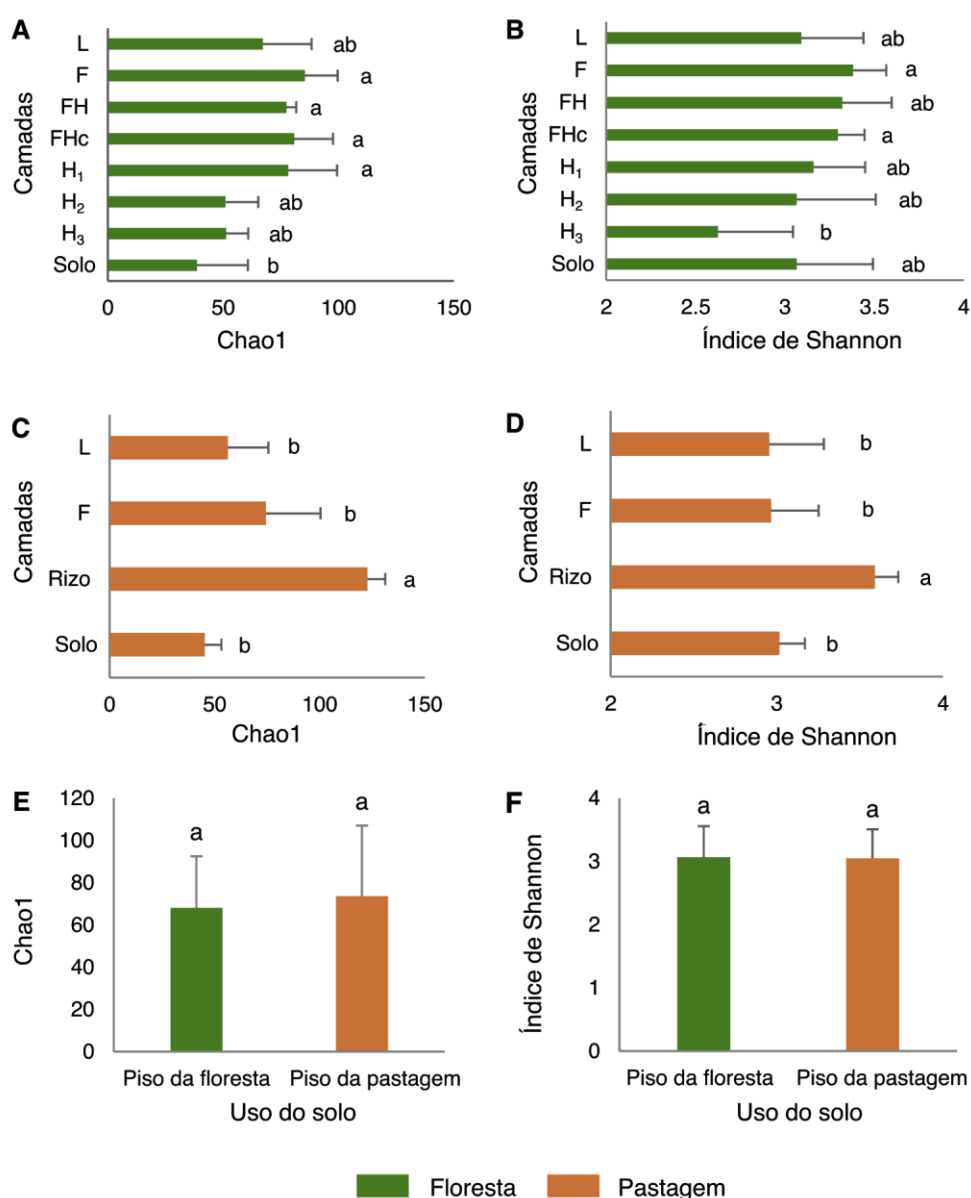


Fonte: Ederson C. Jesus (2018).

3.3 Diversidade de FMA

Com os dados rarefeitos, foram avaliados os índices de diversidade alfa (Chao1 e Shannon). Na floresta, observou-se maior riqueza nas camadas com folhas em estágio inicial de decomposição (F e FH) e com abundância de raízes finas (FHc e H₁) em relação ao solo mineral ($F = 5.1328$, $p < 0.001$). Entretanto, não houve diferença entre a riqueza das camadas orgânicas (Figura 6A). Maior diversidade ($F = 2.4978$, $p = 0.0388$) foi observada apenas em F e FHc em relação a H₃ (Figura 6B). Na pastagem, a maior riqueza ($F = 14.5418$, $p < 0.001$) e diversidade ($F = 6.2128$, $p = 0.0075$) estavam associadas à rizosfera (Figura 6CD). Não houve diferença de riqueza ($F = 0.4834$, $p = 0.4826$) e diversidade ($F = 4e-04$, $p = 0.984$) de FMA entre os usos do solo (Figura 6EF).

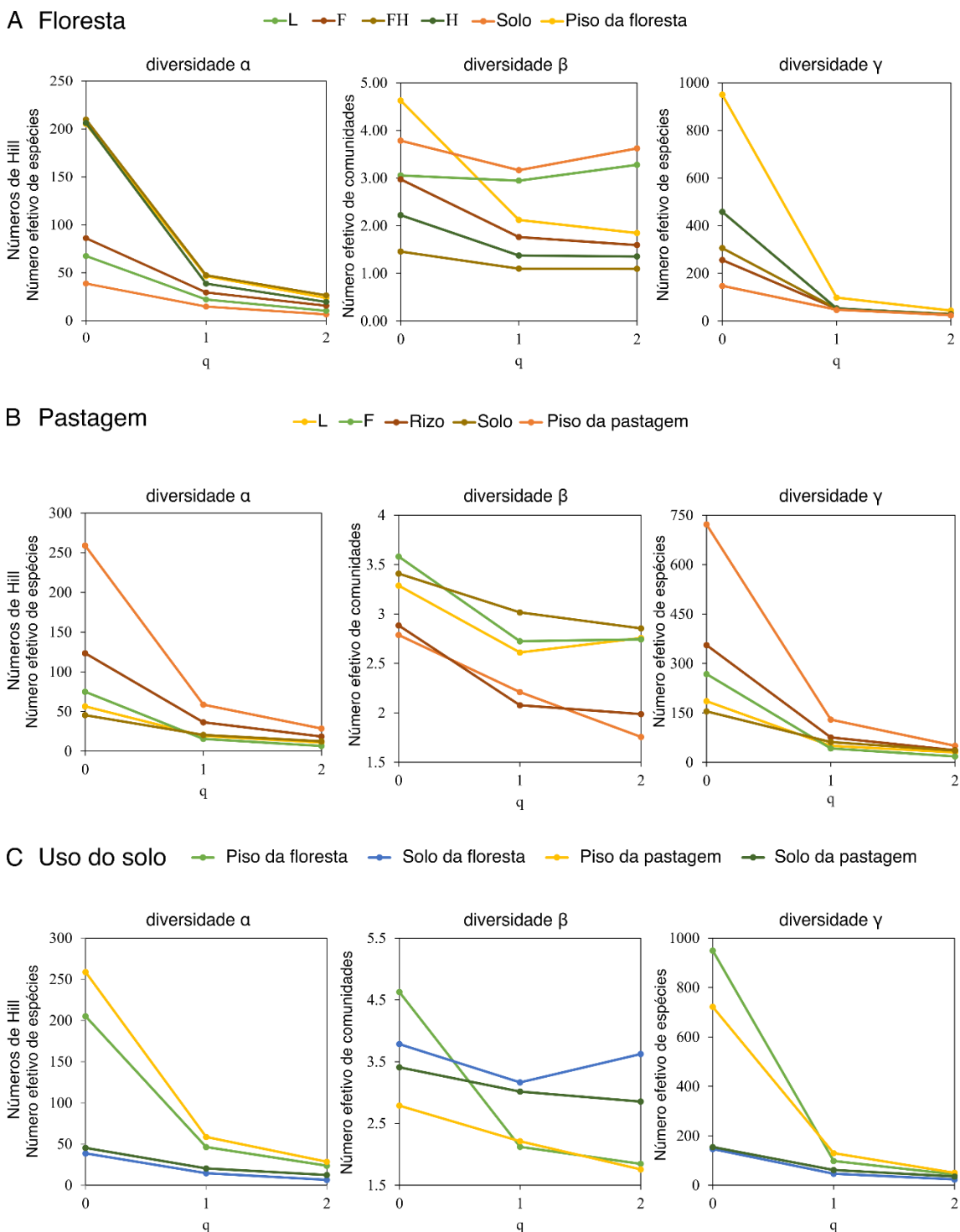
Figura 6 – Índices de diversidade Chao1 e Shannon das camadas da floresta (A, B), da pastagem (C, D) e uso do solo (E, F). Barras representam o desvio padrão das amostras. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p = 0.05$). L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.



Também foi realizada a análise de partição de diversidade para observar como as camadas orgânicas contribuem na diversidade dos sistemas. Os valores de FH e H para todas as ordens de diversidade alfa (diversidade local) foram similares aos valores encontrados para o piso da floresta (todas as camadas da floresta de forma conjunta). Já para a diversidade beta, o solo da floresta apresentou os maiores valores para todas ordens, ou seja, $q = 0$ (riqueza de ASVs), $q = 1$ (exponencial da entropia de Shannon) e $q = 0$ (inverso de Simpson), mas a camada L também destacou-se nos valores diversidade ($q = 1$) e dominância de comunidades ($q = 2$). A diversidade gama diferenciou-se para as camadas da floresta apenas para a riqueza de ASVs, sendo mais elevada no piso da

floresta e, individualmente, na camada H. Na pastagem, os resultados da rizosfera parecem ter impulsionado os valores para o piso da pastagem. Na diversidade alfa, a rizosfera apresentou os maiores valores para as ordens $q = 0$ e $q = 1$, resultado em incrementos para o piso florestal. Resultados semelhantes foram observados na diversidade gama da pastagem. Já na diversidade beta, a rizosfera apresentou os menores valores para todas as ordens e assim, os resultados do piso da pastagem também foram inferiores às demais camadas. Comparando os dois sistemas de uso do solo, a diversidade alfa dos solos da floresta e pastagem foram similares. Ao considerar as camadas em conjunto, os números efetivos de comunidades seguiram próximos, apenas com uma diferença para a riqueza de ASVs ($q = 0$). Entretanto, a adição das camadas orgânicas conferiu um incremento em relação ao solo mineral de ambos os sistemas, principalmente para a riqueza de ASVs e diversidade de Shannon. Para diversidade beta, o piso da floresta foi superior ao piso da pastagem apenas em riqueza de ASVs. Percebeu-se que o solo mineral de ambas os sistemas apresentaram maiores valores de diversidade ($q = 1$) e dominância ($q = 2$) em relação aos valores de seus respectivos pisos. Na diversidade gama, a riqueza de ASVs do piso da floresta foi superior ao piso da pastagem.

Figura 7 – Análise de partição de diversidade para camadas orgânicas e solo mineral da floresta e pastagem. Hill numbers: $q = 0$, riqueza de ASVs; $q = 1$, exponencial da entropia de Shannon para ASVs igualmente ponderadas; $q = 2$, inverso do índice de Simpson para taxas dominantes.



4 DISCUSSÃO

A serapilheira contribui para a nutrição das florestas tropicais, fornecendo nutrientes e também os retendo no ecossistema (KRISHNA; MOHAN, 2017; SAYER et al., 2020). Os FMA estão ligados a estes processos (HERMAN et al., 2012), principalmente devido à elevada concentração de raízes finas na serapilheira. A conversão da floresta amazônica para áreas agrícolas geralmente é realizada pelo sistema de corte e queima, que tem efeitos, principalmente nas camadas mais superficiais do solo (DA SILVA NETO et al., 2019), reduzindo significativamente a biomassa microbiana (WANG et al., 2012) e sua estrutura filogenética (FERRENBURG et al., 2013), o que, conseqüentemente, altera a composição e funcionalidade das comunidades microbianas (XIANG et al., 2015). No presente estudo, as diversidades de FMA da floresta e da pastagem foram calculadas considerando conjuntamente as camadas orgânicas e o solo mineral. Não foi observada diferença entre a diversidade alfa do piso da floresta e o piso da pastagem (considerando todas as camadas) e a análise de partição de diversidade também não mostrou diferença entre o solo da floresta e o da pastagem. Entretanto, a adição das camadas orgânicas, incrementou, principalmente, a riqueza de ASVs ($q = 0$), sugerindo uma importante contribuição para a comunidade de FMA nos dois sistemas de uso. Devido a elevada concentração de raízes nas camadas orgânicas da floresta, era esperado que a diversidade de FMA diminuíssem na pastagem, entretanto gramíneas como as braquiárias também apresentam elevado volume de raízes, o que pode ter, de certa forma, compensado a perda das raízes das camadas orgânicas da floresta. Entretanto, é necessário considerar que solos agrícolas e pastagens tem suas atividades concentradas no solo mineral, enquanto algumas florestas, como a abordada neste estudo, dependem fortemente das camadas orgânicas acima do solo mineral. Além disso, apesar da diversidade alfa não ter se alterado, houve uma mudança na composição das comunidades de FMA, como será discutido adiante. Para a diversidade beta, os valores dos pisos da floresta e da pastagem foram inferiores aos de seus respectivos solos minerais. Esse resultado é bastante interessante, pois mostra que a exclusão das camadas orgânicas pode superestimar a diversidade beta dos FMA, exceto para valores de riqueza de ASVs. Portanto, apesar de não haver diferença na diversidade alfa, a pastagem abriga uma riqueza de ASVs mais homogênea em relação à floresta. Isso pode afetar a preservação da estrutura funcional dos FMA, pois diferentes comunidades de fungos AM afetam

diferencialmente o desempenho das plantas (WILLIAN et al., 2011; GÁRCIA DE LEÓN et al., 2018).

Outros estudos já realizados na Amazônia, basearam-se em recuperação direta de esporos ou em culturas armadilhas (LEAL et al., 2013; LEAL et al., 2009; STÜRMER; SIQUEIRA, 2011) e até onde temos conhecimento, esse é o primeiro estudo a acessar as comunidades de FMA da Amazônia por meio do sequenciamento de alto rendimento. Em síntese, os poucos trabalhos existentes encontraram maior abundância dos esporos das espécies de FMA na pastagem, mas não observaram diferenças da riqueza e diversidade entre floresta e pastagem. Apesar disso, houve mudança na composição de FMA entre os usos do solo, concordando com os achados destes estudos. Na pastagem, houve um aumento de *Paraglomus*, *Scutellospora*, *Archaeospora* e *Diversispora*, em detrimento da redução de *Glomus*, indicando que alguns taxa podem ser favorecidos com a conversão. *Glomus* é considerado um gênero de elevada eficiência de colonização radicular e pode ser mais competitivo na floresta frente à instabilidade das camadas LFH em decorrência do constante aporte de material vegetal e as flutuações de umidade e temperatura (MUNDRA et al., 2021). A dominância de *Glomus* e *Acaulospora* no solo é frequentemente relatada. Entretanto, foi encontrada abundância relativamente baixa de *Acaulospora* nos dois usos da terra (aproximadamente 4% em ambos). Abaixo de *Glomus*, *Paraglomus* foi o gênero mais abundante, com maior expressividade na pastagem. Fatores como comunidade de plantas e propriedades do solo influenciam na composição das comunidades de FMA (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2015; ZHANG et al., 2020). Assim, destaca-se a necessidade de mais estudos para compreensão dos fatores que estruturam as comunidades tanto entre os usos da terra, quanto ao longo dos estratos estudados.

Comparando os índices de diversidade alfa individualmente das camadas orgânicas com o solo mineral da floresta, a camada F, juntamente com FH, FHc e H1, apresentou maior riqueza de FMA. Esse resultado era esperado para as camadas relacionadas às raízes (FH, FHc e H1) devido à condição desses fungos de biotróficos obrigatórios. A presença de FMA em folhas em decomposição (e também em folhas frescas) é um assunto ainda em discussão, apesar de estudos demonstrarem que essa pode ser uma estratégia no aproveitamento dos nutrientes recém mineralizados antes que sejam lixiviados ou complexados no solo (ARISTIZÁBAL et al., 2003; BUNN et al., 2019; CAMENZIND; RILLIG, 2013; DÍAZ-ARIZA; RIVERA et al., 2021). Em um estudo

recente, Bunn et al. (2021) levantaram questões relevantes sobre a presença de FMA na serapilheira, argumentando que a falta de investigações nessa região do solo, pode ocultar a verdadeira participação dos FMA no ciclo direto de nutrientes no solo. A presença de FMA nas camadas de folhas sugere que esses fungos podem contribuir mais do que se pensava para a dinâmica de nutrientes da floresta Amazônica e para a estrutura das comunidades microbianas das camadas orgânicas, pois já foi observado que podem favorecer ou retardar a decomposição da serapilheira através de mecanismos como rizodeposição e competição por recursos com outras comunidades (BÖDEKER et al., 2016; HERMAN et al., 2012; HODGE et al., 2001; JANSA et al., 2013; LANG et al., 2021; LEIFHEIT et al., 2015; LEIGH et al., 2011; NUCCIO et al., 2013). De fato, o conjunto de camadas de maior riqueza em relação ao solo mineral (F, FH, FHc e H1), apresentou uma comunidade de FMA totalmente distinta das demais da floresta. Além disso, houve uma tendência de maior diversidade alfa nessas camadas.

Na pastagem, a riqueza e diversidade de FMA destacaram-se na região da rizosfera, o que pode ser atribuído à afinidade de FMA por gramíneas (ÁLVAREZ-LOPZTELLO et al., 2019). A comunidade de FMA da rizosfera não diferiu da encontrada no solo mineral, provavelmente pela sua proximidade e ao crescimento do micélio extrarradicular. Entretanto, também foi observada presença de FMA nas camadas L e F na pastagem e acredita-se que esta seja a primeira observação de FMA em folhas de pastagem, indicando que esses fungos também colonizam a serapilheira de agroecossistemas. Díaz-Ariza et al. (2021) encontraram FMA colonizando folhas e material orgânico em decomposição em cafezais sob diferentes manejos e observaram que o comprimento médio das hifas era maior no material em decomposição, sugerindo a absorção de nutrientes recém mineralizados desse material. Sheldrake et al. (2017), em um estudo de longo prazo, mostraram que a presença da serapilheira em decomposição também foi importante para a determinação da extensão da colonização radicular por esses fungos. Assim, sugere-se mais estudos para uma melhor compreensão da presença de FMA em agroecossistemas.

As camadas da serapilheira formaram comunidades distintas (L e F, na floresta, e L, na pastagem) dentro de seus ambientes e alguns gêneros podem ter sido cruciais, sugerindo uma preferência dos taxa por folha, húmus ou solo (BUNN et al., 2019). *Acaulospora*, por exemplo, apresentou uma redução de abundância significativa a partir da camada F da floresta e, na pastagem, juntamente com *Scutellospora*, não foi

quantificada em L. Ainda na camada L da pastagem, houve uma super-representação de *Paraglomus* (mais de 80% de abundância relativa). A colonização da serapilheira por FMA parece não depender da taxa de colonização das raízes (POSADA et al., 2012) e a presença desses fungos em folhas ainda não decompostas, já foi sugerida como uma forma de “reconhecimento” de um substrato que futuramente possa ser uma fonte de nutrientes (BUNN et al., 2019), embora os resultados do presente estudo indiquem que esse “reconhecimento” não foi generalizado. Na floresta, ao longo das camadas orgânicas foram observadas mais três comunidades distintas entre si e também da formada no solo mineral. Esses resultados indicam que o horizonte orgânico merece mais atenção. Aqui, foi utilizada a estratificação do horizonte orgânico para entender sua contribuição na diversidade da floresta e também da pastagem, mas essa abordagem também pode ser interessante para compreender a interação dos FMA com fungos de vida livre, assim como interações entre reinos como já realizado em regiões de clima temperado e boreal (CARTERON et al., 2021; LINDAHL et al., 2007; MUNDRA et al., 2021) e, recentemente na Amazônia, mas sem focar especificadamente em FMA e na estratificação aqui abordada (RITTER et al., 2021).

O uso do sequenciamento de amplicon direcionado ao estudo de FMA é relativamente recente e ainda existe uma limitação de taxas bem caracterizados em florestas tropicais, conseqüentemente limitando os bancos de dados (MORGAN; EGERTON-WARBURTON, 2017). Aproximadamente, metade das ASVs das camadas H₂ e H₃, da floresta, e F da pastagem, não puderam ser atribuídas a gênero e uma grande porção de todas as camadas à espécie. Apesar de indicar a limitação do banco de dados, esse também pode ser um forte indício da ocorrência de novas espécies na Amazônia. Assim, sugere-se que: 1) as camadas orgânicas do solo sejam incluídas nas análises de diversidade de FMA; 2) a associação de análises moleculares e morfológicas (LEAL et al., 2017) seja realizada com a abordagem de estratificação do horizonte orgânico do solo para explorar os taxas ainda desconhecidos e aumentar as bases de dados com espécies de FMA de florestas tropicais; 3) outros estudos sejam realizados para entender a dinâmica dos FMA na serapilheira tanto da floresta, como em sistemas gerenciados, e sua real contribuição para ciclagem de nutrientes em ecossistemas tropicais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo fornecem uma visão de como as camadas orgânicas da floresta, mas também da pastagem, contribuem para a diversidade de FMA do solo. Por serem biotróficos obrigatórios, a riqueza de FMA foi maior nas camadas ligadas às raízes das plantas, entretanto, essas camadas estão localizadas em compartimentos diferentes na floresta e pastagem. Enquanto a floresta concentra suas raízes na serapilheira para aquisição de nutrientes, as da pastagem exploram o solo mineral. Portanto, as peculiaridades desses sistemas devem ser consideradas nos estudos sobre os efeitos da conversão floresta-pastagem nas comunidades de FMA do solo, pois, apesar de não ter sido encontrada diferença na diversidade alfa dos sistemas, houve modificação das estruturas das comunidades de FMA. A presença de FMA nas camadas de folhas e húmus na floresta, reforça sua participação na conservação de nutrientes na Amazônia e, na pastagem, sugere que a manutenção da serapilheira em sistemas gerenciados pode ser uma prática agrícola sustentável.

REFERÊNCIAS

- ARISTIZÁBAL, C.; RIVERA, E. L.; JANOS, D. P. **Arbuscular mycorrhizal fungi colonize decomposing leaves of *Myrica parvifolia*, *M. pubescens* and *Paepalanthus* sp.** *Mycorrhiza*, v. 14, n. 4, p. 221–228, 2003.
- BÖDEKER, I.T.M. *et al.* **Mycorrhizal and saprotrophic fungal guilds compete for the same organic substrates but affect decomposition differently.** *Functional Ecology*, v. 30, n. 12, p. 1967–1978, 2016.
- BUNN, R.A. *et al.* **Revisiting the ‘direct mineral cycling’ hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why?** *The ISME Journal*, v. 13, n. 8, p. 1891–1898, 2019.
- CALLAHAN, B.J. *et al.* **High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature Methods*, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- CAMENZIND, T.; RILLIG, M. C. **Extraradical arbuscular mycorrhizal fungal hyphae in an organic tropical montane forest soil.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 64, p. 96–102, 2013.
- CARTERON, A. *et al.* **Temperate forests dominated by arbuscular or ectomycorrhizal fungi are characterized by strong shifts from saprotrophic to mycorrhizal fungi with increasing soil depth.** *Microbial Ecology*, v. 82, p. 377–390, 2021.
- DA SILVA NETO, E. C. *et al.* **Temporal evaluation of soil chemical attributes after slash-and-burn agriculture in the Western Brazilian Amazon.** *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 41, n. 1, 2019.
- DÍAZ-ARIZA, L.A.; RIVERA, E.L.; SÁNCHEZ, N. **Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in leaf litter and roots of shaded coffee plantations under organic and conventional management.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 45, e0200110, 2021.
- FERRENBURG, S. *et al.* **Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance.** *The ISME Journal* 2013 7:6, v. 7, n. 6, p. 1102–1111, 2013.
- GARCÍA DE LEÓN, D. *et al.* **Anthropogenic disturbance equalizes diversity levels in arbuscular mycorrhizal fungal communities.** *Global Change Biology*, v. 24, n. 6, p. 2649–2659, 2018.
- HERMAN, D.J. *et al.* **Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, n. 1, p. 236–247, 2012.

HODGE, A.; CAMPBELL, C.D.; FITTER, A.H. **An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material.** *Nature*, v. 413, n. 6853, p. 297–299, 2001.

JANSA, J.; BUKOVSKÁ, P.; GRYNDLER, M. **Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts – or just soil free-riders?** *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 134, 2013.

KRISHNA, M.P.; MOHAN, M. **Litter decomposition in forest ecosystems: a review.** *Energy. Ecology and Environment*, v. 2, n. 4, p. 236–249, 2017.

LANG, A. K. *et al.* **Fine roots and mycorrhizal fungi accelerate leaf litter decomposition in a northern hardwood forest regardless of dominant tree mycorrhizal associations.** *New Phytologist*, v. 230, n. 1, p. 316–326, 2021.

LEAL, P.L. *et al.* **Assessment of the occurrence and richness of arbuscular mycorrhizal fungal spores by direct analysis of field samples and trap culture - a comparative study.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 2359–2373, 2017.

LEAL, P.L. *et al.* **Assessment of the occurrence and richness of arbuscular mycorrhizal fungal spores by direct analysis of field samples and trap culture – A comparative study.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 2, p. 2359–2373, 2018.

LEAL, P. L.; SIQUEIRA, J. O.; STÜRMER, S. L. **Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community.** *Applied Soil Ecology*, v. 71, p. 72–80, 2013.

LEAL, P.L.; STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. **Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 111–121, 2009.

LEIFHEIT, E.F.; VERBRUGGEN, E.; RILLIG, M. C. **Arbuscular mycorrhizal fungi reduce decomposition of woody plant litter while increasing soil aggregation.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 81, p. 323–328, 2015.

LINDAHL, B.D. *et al.* **Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest.** *New Phytologist*, v. 173, n. 3, p. 611–620, 2007.

MAIA, L. C. *et al.* **Species diversity of Glomeromycota in Brazilian biomes.** *Sydowia*, v. 72, 2020.

MARTÍNEZ-GARCÍA, L.B. *et al.* **Host identity is a dominant driver of mycorrhizal fungal community composition during ecosystem development.** *New Phytologist*, v. 205, n. 4, p. 1565–1576, 2015.

- MORGAN, B. S. T.; EGERTON-WARBURTON, L. M. **Barcoded NS31/AML2 primers for sequencing of arbuscular mycorrhizal communities in environmental samples.** *Applications in Plant Sciences*, v. 5, n. 8, p. 1700017, 2017.
- MUNDRA, S. *et al.* **Soil depth matters: shift in composition and inter-kingdom co-occurrence patterns of microorganisms in forest soils.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 3, p. fiab022, 2021.
- NUCCIO, E.E. *et al.* **An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition.** *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1870–1881, 2013.
- ÖPIK, M. *et al.* **The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota).** *New Phytologist*, v. 188, p. 223–241, 2010.
- PEREIRA, C.M.R. *et al.* **Management practices may lead to loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in protected areas of the Brazilian Atlantic Forest.** *Fungal Ecology*, v. 34, p. 50–58, 2018.
- POSADA, R. H.; MADRIÑAN, S.; RIVERA, E. L. **Relationships between the litter colonization by saprotrophic and arbuscular mycorrhizal fungi with depth in a tropical forest.** *Fungal Biology*, v. 116, n. 7, p. 747–755, 2012.
- RITTER, C. D. *et al.* **Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity.** *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 14, p. 7509–7524, 2020.
- RITTER, C. D. *et al.* **Assessing biotic and abiotic interactions of microorganisms in Amazonia through co-occurrence networks and DNA metabarcoding.** *Microbial Ecology 2021*, p. 1–15, 2021.
- SAYER, E.J. *et al.* **Revisiting nutrient cycling by litterfall—Insights from 15 years of litter manipulation in old-growth lowland tropical forest.** *Advances in Ecological Research*, v. 62, p. 173–223, 2020.
- SHELDRAKE, M. *et al.* **Arbuscular mycorrhizal fungal community composition is altered by long-term litter removal but not litter addition in a lowland tropical forest.** *New Phytologist*, v. 214, n. 1, p. 455–467, 2017.
- SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. **Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species.** *Mycorrhiza* 2001 11:5, v. 11, n. 5, p. 245–255, 2001.
- STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. **Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon.** *Mycorrhiza*, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.

WANG, Q.; ZHONG, M.; WANG, S. **A meta-analysis on the response of microbial biomass, dissolved organic matter, respiration, and N mineralization in mineral soil to fire in forest ecosystems.** *Forest Ecology and Management*, v. 271, p. 91–97, 2012.

WILLIAMS, A.; RIDGWAY, H. J.; NORTON, D. A. **Growth and competitiveness of the New Zealand tree species *Podocarpus cunninghamii* is reduced by ex-agricultural AMF but enhanced by forest AMF.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, n. 2, p. 339–345, 2011.

XIANG, X. *et al.* **Arbuscular mycorrhizal fungal communities show low resistance and high resilience to wildfire disturbance.** *Plant and Soil* 2015 397:1, v. 397, n. 1, p. 347–356, 2015.

ZHANG, J. *et al.* **Plant community and soil properties drive arbuscular mycorrhizal fungal diversity: A case study in tropical forests.** *Soil Ecology Letters*, v. 3, n. 1, p. 52–62, 2020.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Propriedades químicas das camadas orgânicas da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições. L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

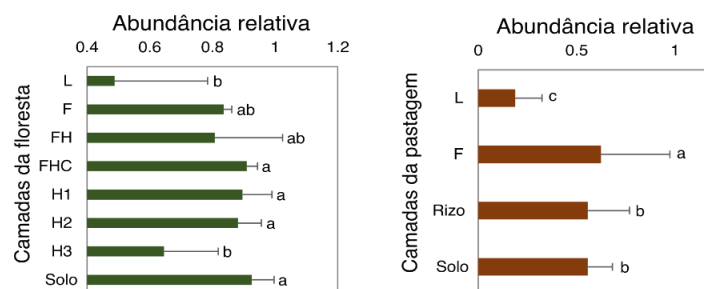
Propriedades	Unidade	Floresta					Pastagem	
		L	F	FHc	H ₁	H ₂	L	F
N	g Kg ⁻¹	13.1 ± 2.5	16.3 ± 2.6	18.8 ± 2.9	12.8 ± 5.6	12.6 ± 2.6	7.35 ± 1.2	7.5 ± 2.3
P	g Kg ⁻¹	272.2 ± 102.3	318.8 ± 75.1	294.0 ± 67.1	156.7 ± 64.7	126.6 ± 16.2	192.4 ± 45.3	182.6 ± 37
K	mg Kg ⁻¹	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.08	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.09	0.3 ± 0.05
Ca	mg Kg ⁻¹	5325 ± 1670	4145 ± 1027	1576 ± 857	301 ± 35	273 ± 148	5195 ± 504	3840 ± 245
Mg	mg Kg ⁻¹	2054 ± 688.3	1638 ± 716	803 ± 375	282 ± 182	210 ± 148	1298 ± 504	797 ± 225
Cu	mg Kg ⁻¹	85.6 ± 93.9	4.9 ± 1.3	4.02 ± 1.3	1.5 ± 0.5	0.26 ± 0.6	5.13 ± 2.3	3.42 ± 0.9
Fe	mg Kg ⁻¹	149.2 ± 45.8	269.6 ± 47.4	398.80 ± 75.3	393.40 ± 156.5	383.40 ± 117	344.40 ± 81.8	2514.4 ± 899.9
Mn	mg Kg ⁻¹	90.3 ± 29.5	91.9 ± 37.5	60.24 ± 21.1	17.66 ± 3.9	8.91 ± 3.5	99.34 ± 26.4	94.98 ± 24
Zn	mg Kg ⁻¹	16.5 ± 2.5	19.6 ± 7.9	17.80 ± 6.2	8.29 ± 3.3	7.21 ± 2.2	28.74 ± 3.2	21.08 ± 4
13C	g Kg ⁻¹	466.37 ± 22.5	476.5 ± 20.3	478.24 ± 30.7	417.54 ± 74.1	368.67 ± 29.9	425.13 ± 12.6	247.06 ± 28
15N	g Kg ⁻¹	1.3 ± 0.3	1.64 ± 0.2	1.91 ± 0.3	1.96 ± 0.5	1.61 ± 0.3	0.73 ± 0.2	0.70 ± 0.08
C:N	-	40 ± 8	40 ± 8	25 ± 3	22 ± 4	24 ± 7	57 ± 3	35 ± 5

APÊNDICE B - Propriedades químicas das camadas organominerais da floresta e da pastagem. Valores representam a média e o desvio padrão de cinco repetições.

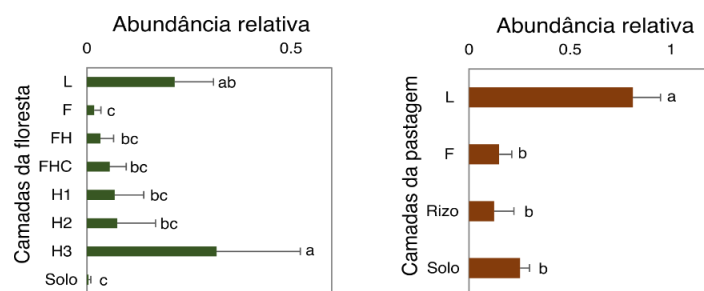
Propriedades	Unidade	Floresta		Pastagem	
		H ₃	Solo	Solo	Rizosfera
C org	g Kg ⁻¹	82.9 ± 18.1	15.86 ± 3.7	10.62 ± 1.3	17.98 ± 3.8
N	g Kg ⁻¹	5.6 ± 1.0	1.16 ± 0.4	0.96 ± 0.15	1.48 ± 0.3
P	mg Kg ⁻¹	7.4 ± 1.5	2.40 ± 1.5	2.60 ± 2.07	4.40 ± 0.9
Ca ²⁺	cmol Kg ⁻¹	0.8 ± 0.3	0.22 ± 0.08	1.24 ± 0.4	2.08 ± 0.6
Mg ²⁺	cmol Kg ⁻¹	1.0 ± 0.4	0.22 ± 0.005	0.54 ± 0.4	0.8 ± 0.2
K ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.16 ± 0.05	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Na ⁺	cmol Kg ⁻¹	0.18 ± 0.11	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005
Cu	mg Kg ⁻¹	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.07
Fe	mg Kg ⁻¹	8.13 ± 1.3	3.96 ± 0.9	17.38 ± 4.9	22.90 ± 5.1
Mn	mg Kg ⁻¹	3.46 ± 2.8	0.34 ± 0.3	9.58 ± 2.5	4.81 ± 1.1
Zn	mg Kg ⁻¹	5.30 ± 3.4	0.72 ± 0.2	2.00 ± 0.7	0.93 ± 0.2
Al ³⁺	cmol Kg ⁻¹	3.94 ± 0.9	1.04 ± 0.4	0.01 ± 0	0
pH (H ₂ O)	-	3.82 ± 0.2	4.3 ± 0.3	5.68 ± 0.4	5.76 ± 0.2
13C	g Kg ⁻¹	13.60 ± 2.3	2.43 ± 0.5	1.26 ± 0.2	2.95 ± 0.7
15N	g Kg ⁻¹	0.67 ± 0.09	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.04
C:N	-	20 ± 1	21 ± 6	15 ± 0.4	16 ± 1

APÊNDICE C – Abundância relativa dos principais gêneros de FMA nas camadas orgânicas e solo mineral da floresta e pastagem. As barras representam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. L representa camada de folhas inteiras; F, folhas fragmentadas; FH, mistura de folhas fragmentadas e húmus; H₁, húmus com raízes finas; H₂, húmus; H₃, húmus misturado ao material mineral do solo; Rizo, solo rizosférico.

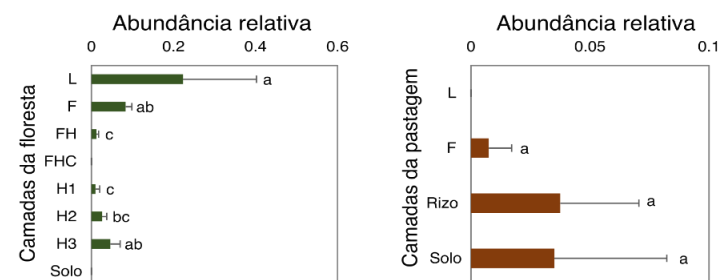
Glomus



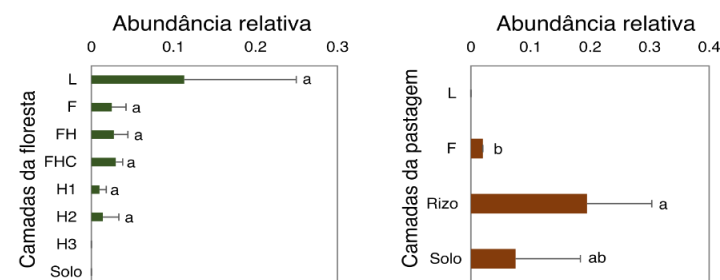
Paraglomus



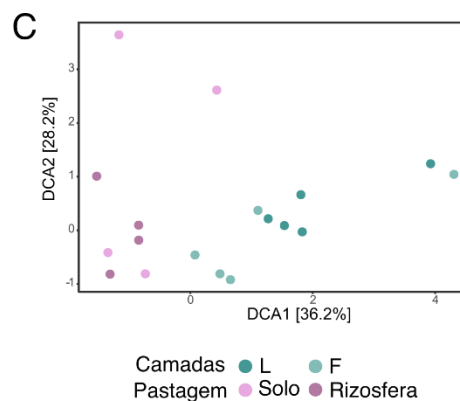
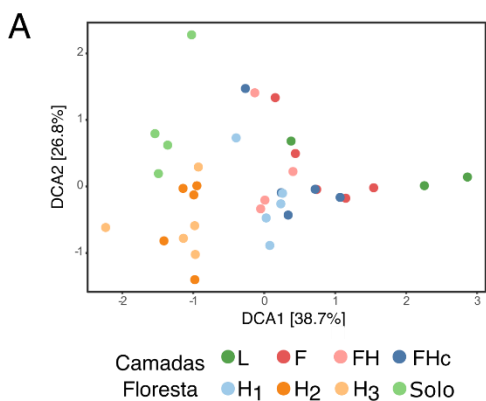
Acaulospora



Scutellospora



Apêndice D – Análise de correlação destendenciada (DCA) das camadas orgânicas e solo mineral das floresta (A) e da pastagem (B).



B

	Floresta			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.546	0.377	0.281	0.205
Valores Decorana	0.569	0.356	0.259	0.120
Comprimento do eixo	5.100	3.681	2.771	2.159

D

	Pastagem			
	DCA1	DCA2	DCA3	DCA4
Autovalores	0.744	0.580	0.428	0.305
Valores Decorana	0.777	0.603	0.398	0.211
Comprimento do eixo	5.832	4.566	2.826	2.204

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados aqui apresentados mostram, em conjunto, a relevância das camadas orgânicas como reservatório de diversidade microbiana e apontam para o seu potencial para a manutenção dos ciclos de nutrientes em ambientes naturais e agrícolas. Foi revelada uma diversidade distinta de microrganismos nas diferentes camadas, o que já era esperado devido à sua natureza distinta (Figuras 2 e 3 e Apêndices B e C do segundo capítulo). A distribuição das diferentes espécies, seja de fungos ou bactérias, acompanhou os diferentes graus de decomposição da matéria orgânica, permitindo observa-se um gradiente de composição de espécies na forma de um *ecocline* para todos os grupos avaliados. O papel funcional desses organismos precisa ainda ser estabelecido, porém, pode-se conjecturar que a perda dessa diversidade possa ser significativamente impactante para o funcionamento do sistema solo visto a importância da serapilheira e produtos de sua decomposição para a manutenção da floresta em solos ácidos e de baixa fertilidade (HERRERA et al., 1978; SAYER et al., 2010; GIWETA, 2020). Este é um dos aspectos que precisa ser investigado em estudos futuros juntamente com propriedades funcionais dessas comunidades, como já tem sido feito para o solo mineral (PAULA et al., 2014; MENDES et al., 2015; MERLOTI et al., 2019; MEYER et al., 2018; KROEGER et al., 2018;2020).

A serapilheira é o primeiro estrato a ser afetado pelo fogo em incêndios florestais. Em alguns casos, a floresta permanece “em pé”, porém esse estrato é consumido, o que certamente afeta os ciclos biogeoquímicos (BARLOW et al., 2016; 2020). A deposição das cinzas tem impacto direto sobre as comunidades do solo mineral, conforme demonstrado por Carvalho et al. (2016), que verificou mudanças na estrutura de comunidades de solo onde a floresta permaneceu “em pé”, mas foi afetada pelo fogo. Com a queima da serapilheira e outros estratos orgânicos, as comunidades presentes nesses estratos superiores do “piso da floresta” são seriamente afetadas, senão eliminadas. Esses impactos podem ser temporários, porém fica a questão de qual nível seria suficiente para levar essa perda de diversidade para um caminho irreversível.

A camada H₂ do “piso da floresta” se mostrou um importante compartimento para genes funcionais do ciclo do N. Além disso, ela se destacou pela maior diversidade de bactérias e apresentou redes de correlação mais complexas para fungos totais. Isso sugere

que essa camada seja relevante para interação entre microrganismos e para a manutenção dos ciclos de nutrientes do solo florestal estudado.

Adicionalmente, conforme destacado no segundo capítulo, a serapilheira do pasto, em especial a camada F, surpreendeu ao abrigar uma alta abundância de organismos do ciclo do N, ressaltando que essa fração do “piso da pastagem” pode ter uma importância maior do que esperado para a manutenção desse ciclo. Isso levanta questões sobre sua importância em outros sistemas antropizados, como vários sistemas agrícolas e indica que as comunidades microbianas da matéria vegetal deixada sobre o solo podem ter um papel relevante e que se soma ao dos organismos do solo mineral. Sistemas que favorecem o acúmulo de palhada como o Plantio Direto ou sistemas agroecológicos podem, dessa forma, estar contribuindo com comunidades importantes para garantir a sustentabilidade do sistema solo-planta.

Face a essas considerações, propõe-se a ampliação da abordagem aqui utilizada para outras regiões e tipos de floresta, visto que a distribuição e acumulação da matéria orgânica é variável em diferentes ambientes (JEFFERY et al., 2010). O estudo realizado por Rocha et al. (2021) aponta a relevância dessa abordagem em outros ambientes de floresta da Amazônia. Além disso, estudos futuros ajudarão a determinar o grau de importância funcional dos microrganismos dessas camadas, seja por meio de medições bioquímicas, isotópicas ou metagenômica e outras “ômicas”.

REFERÊNCIAS

- BARLOW, J. *et al.* **Clarifying Amazonia's burning crisis.** *Global Change Biology*, 26: 319-321, 2020.
- BARLOW, J. *et al.* **Anthropogenic disturbance in tropical forests can double biodiversity loss from deforestation.** *Nature*, v. 7, p. 144-147, 2016.
- GIWETA, M. **Role of litter production and its decomposition, and factors affecting the processes in a tropical forest ecosystem: A review.** *Journal of Ecology and Environment Central*, v. 44, n. 11, 2020.
- HERRERA, R.; KLINGE, H.; MEDINA, E. **Amazon ecosystems: their structure and functioning with particular emphasis on nutrients.** *Interciencia*, v. 3, n. 4, p. 223–231, 1978.
- JEFFERY, S. *et al.* **European Atlas of Soil Biodiversity.** Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2010.
- KROEGER, M.E. *et al.* **New biological insights into how deforestation in Amazonia affects soil microbial communities using metagenomics and metagenome-assembled genomes.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1635, 2018.
- KROEGER, M.E. *et al.* **Rainforest-to-pasture conversion stimulates soil methanogenesis across the Brazilian Amazon.** *The ISME Journal*, v. 15, n. 3, p. 658–672, 2021.
- MENDES, L.W. *et al.* **Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function.** *Microbial Ecology*, v. 70, n. 1, p. 255–265, 2015.
- MERLOTI, L.F. *et al.* **Forest-to-agriculture conversion in Amazon drives soil microbial communities and N-cycle.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 137, p. 107567, 2019.
- MEYER, K.M. *et al.* **Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms.** *Molecular Ecology*, v. 26, n. 6, p. 1547–1556, 2017.
- PAULA, F.S. *et al.* **Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities.** *Molecular Ecology*, v. 23, p. 2988–2999, 2014.
- ROCHA, F. I. *et al.* **Land-use system and forest floor explain prokaryotic metacommunity structuring and spatial turnover in Amazonian forest-to-pasture conversion areas.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12: 657508, 2021.

SAYER, E.J.; TANNER, E.V.J. **Experimental investigation of the importance of litterfall in lowland semi-evergreen tropical forest nutrient cycling.** *Journal of Ecology*, v. 98, n. 5, p. 1052–1062, 2010.