Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Efeito do estresse hídrico na estrutura das comunidades microbianas do solo sob
cultivo de *Eucalyptus grandis*

Felipe Moraes Ribeiro Bozza

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2020

Felipe Moraes Ribeiro Bozza
Engenheiro Agrônomo

Efeito do estresse hídrico na estrutura das comunidades microbianas do solo sob cultivo de
Eucalyptus grandis

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Bozza, Felipe Moraes Ribeiro

Efeito do estresse hídrico na estrutura das comunidades microbianas do solo sob cultivo de *Eucalyptus grandis* / Felipe Moraes Ribeiro Bozza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

70 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Redução de chuvas 2. Eucalipto 3. qPCR 4. Fingerprinting 5. Atividade enzimática I. Título

DEDICO

Ao meu pai Mario Eduardo Ribeiro Bozza (*in memorian*) e minha
mãe Maria Luiza Moraes Bozza,
ao meu irmão Gabriel Moraes. Ribeiro. Bozza
Amo muito vocês

A minha amada companheira Rafaela Nakamashi,
Pelo carinho e paciência em todos os momentos

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço toda a minha família espalhada por Araras, Campinas, Valinhos e demais cidades. Carrego muitas lembranças comigo, obrigado por sempre me apoiarem.

À minha mãe Maria Luiza e meu irmão Gabriel, pelo carinho, compreensão e amor durante toda a minha vida.

Ao tio Ivan, que me passou valiosos ensinamentos.

À minha companheira Rafaela, pelo amor e carinho ao longo dessa jornada.

Aos companheiros do Barney, pela amizade que temos.

À Maraca por todos os momentos que vivemos, em especial ao Gubers, Massacration e Fábio, que tornaram meus dias sempre mais alegres durante o mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP, Alessandra, Alexandre, Ana Luísa, Armando, Bruna, Caio César, Cáo Diniz, Cátia, Danielle, Felipe Martins, Kattia, Kelly, Luana, Rodrigo Taketani, Simone, Tobias, e Yasmin, aos orientados da Prof. Elke, em especial ao Henrique. Pela amizade e ajuda nas diversas etapas durante a elaboração dessa dissertação.

Um agradecimento especial à Kelly pelo companheirismo do dia a dia. A Cátia pela ajuda com as análises enzimáticas. Ao Armando pelas conversas e auxílio com o DGGE. Ao Tobias pela grande ajuda nesse trabalho e pela amizade construída.

Ao pessoal da Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga pelo acolhimento e ajuda na coleta das amostras.

Aos técnicos Denise, Fernando e Sônia por todo o suporte oferecido no laboratório.

À Prof. Àgnès, por todos os ensinamentos e contribuições ao longo desse projeto. Admiro seu amor e dedicação pela ciência.

Ao Prof. Fernando, pelo excelente profissional que é. E pela oportunidade, orientação e confiança depositada em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Planta pela oportunidade de cursar o mestrado e o suporte oferecido ao longo dele.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, pela estrutura e oportunidades oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 131710/2018-4).

A FAPESP, CIRAD, USP/COFECUB e AGREENIUM pelas verbas destinadas ao experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Cultivo de eucalipto no Brasil e impacto das mudanças climáticas	11
2.2. Impacto de um estresse hídrico sobre o funcionamento biológico do solo	13
2.2.1. Impacto sobre as comunidades microbianas	13
2.2.2. Impacto sobre comunidades funcionais ligadas ao ciclo N	14
2.2.3. Impacto sobre indicadores biológicos de qualidade do solo	17
2.3. Impacto de um gradiente vertical ao longo de um perfil de solo sobre as comunidades microbianas	18
2.4. Metodologias para estudar a diversidade e funcionalidade microbiana	19
2.4.1. Metodologias de quantificação do DNA	19
2.4.1.1. Quantificação por espectrofotometria UV	19
2.4.1.2. Quantificação por fluorimetria	20
2.4.1.3. Quantificação por eletroforese em gel de agarose	20
2.4.2. Metodologias moleculares	20
2.4.2.1. Metodologias de fingerprinting (T-RFLP/DGGE)	20
2.4.2.2. Quantitative PCR (qPCR)	21
3. HIPÓTESES	23
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo geral	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. METODOLOGIAS	27
5.1. Área experimental	27
5.2. Delineamento experimental	27
5.3. Amostragem	29
5.3.1. Amostragem para análise por técnicas moleculares	29
5.3.2. Amostragem para análises de solo fresco	31
5.4. Técnicas moleculares	31
5.4.1. Extração de DNA	31
5.4.2. Quantificação do DNA	31
5.4.2.1. Gel de agarose	32
5.4.2.2. Nanodrop	32
5.4.2.3. Picogreen	32
5.4.3. Estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP	33
5.4.4. Estrutura da comunidade fúngica por DGGE	33
5.4.5. Abundância das comunidades por PCR em tempo real (qPCR)	34
5.5. Indicadores Biológicos de atividades microbiana com solo fresco	35
5.5.1. Carbono da biomassa microbiana e respiração basal	35
5.5.2. Atividades enzimáticas	36
5.5.2.1. Fosfatase ácida e alcalina	36

5.5.2.2. β -Glucosidase	36
5.6. Análise estatística.....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSAO	39
6.1. Comparação de metodologias de quantificação do DNA	39
6.2. Estrutura das comunidades bacteriana e fúngica	41
6.2.1. Estrutura da comunidade bacteriana	41
6.2.2. Estrutura da comunidade fúngica.....	45
6.3. Abundância das comunidades microbianas	46
6.4. Efeito das variáveis ambientais na estruturação das comunidades bacteriana e fúngica	49
6.5. Indicadores Biológicos de atividade microbiana	51
7. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	67

RESUMO

Efeito do estresse hídrico na estrutura das comunidades microbianas do solo sob cultivo de *Eucalyptus grandis*

As mudanças climáticas podem levar a reduções nos volumes de chuva, afetando ecossistemas e a produtividade agrícola. Dentre os cultivos que podem ser afetados está o de *Eucalyptus grandis*, que representa 75% da produção de madeira brasileira, e pode sofrer tanto um efeito direto da redução de chuvas quanto um efeito indireto por mudanças na disponibilidade de nutrientes, das quais os micro-organismos estão relacionados. Os micro-organismos do solo desempenham papel essencial na ciclagem de nutrientes e em relações ecológicas, estão distribuídos desde as camadas mais superficiais quanto as mais profundas e seus diferentes grupos podem ser afetados de diferentes maneiras pela redução das chuvas. O objetivo desse trabalho foi de caracterizar a resposta das comunidades microbianas do solo quando submetida a um estresse hídrico prolongado em uma área de cultivo de eucalipto submetida a uma exclusão de chuvas, observando efeitos da época e de um gradiente vertical ao longo do perfil do solo até um metro de profundidade. O experimento foi instalado em 2010 com o plantio de *E. grandis* e a instalação de calhas interceptando 37% da precipitação. Amostras foram coletadas em três profundidades (0-10, 40-50, 90-100 cm) e cinco datas (27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17) ao longo de um ano contemplando épocas com maior e menor incidência de chuva, destinadas as análises moleculares. Uma outra coleta (23/02/19) foi feita durante a época de maior incidência de chuvas sendo destinada à avaliação de bioindicadores em três profundidades (0-10, 10-20, 40-50 cm). Devido às necessidades do projeto, implementou-se um protocolo de quantificação de DNA com o Picogreen™, o qual foi comparado a outros métodos para validação. A avaliação das mudanças na estrutura da comunidade bacteriana e fúngica e foi feita através de técnicas de *fingerprinting* (DGGE e T-RFLP). A abundância dos genes 16S rRNA de bactérias e de arqueias, 18S rRNA de fungos e *nifH* de bactérias fixadoras do N foi estimada por PCR quantitativo. A avaliação dos bioindicadores foi feita através das enzimas β -glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, da respiração do solo e do C da biomassa. A época e a profundidade foram fatores estruturantes das comunidades bacteriana e fúngica, sendo que o efeito da redução de chuvas se mostrou significativo na estruturação de duas datas amostradas para a comunidade bacteriana (em época de maior e menor incidência de chuvas). A abundância dos genes 16S de arqueias e 18S de fungos foi diminuída em função da redução de chuvas em uma das datas amostradas, os demais genes não apresentaram mudanças. A biomassa e a respiração do solo não apresentaram efeito do tratamento e somente a segunda apresentou efeito da profundidade. As atividades enzimáticas reduziram com o aumento da profundidade enquanto que a redução de chuvas levou a um aumento da atividade, sendo esse efeito proeminente em superfície para a β -glucosidase e fosfatase ácida e em profundidade para fosfatase alcalina. Neste estudo foi verificado o efeito da redução de chuvas sobre as comunidades microbianas, embora em menor proporção que as variações sazonais e da profundidade, mostra-se que são necessários mais estudos para melhor compreensão do impacto da redução da chuva no funcionamento microbiológico dos solos.

Palavras-chave: Redução de chuvas, Eucalipto, qPCR, *Fingerprinting*, Atividade enzimática

ABSTRACT

Effect of water stress on the structure of soil microbial communities under *Eucalyptus grandis* plantation

Climate change may lead to rainfall reduction, affecting ecosystems and agriculture productivity. Among the crops that could be impacted is *Eucalyptus grandis*, which represents 75% of Brazilian wood production, and can be affected both direct effect of rainfall reduction and indirect effect by changes in nutrient availability in which microorganisms are involved. Soil microorganisms play an essential role in nutrient cycling ecological relationship, they are distributed from the most superficial to the deepest soil layers, and their different groups can be affected in different ways by the rainfall reduction. This study aimed to characterize soil microbial community responses when subjected to a prolonged water stress in eucalyptus plantation, evaluating seasonal effects and a vertical soil gradient up to one meter deep. The experiment was setup in 2010 with *E. grandis* and installation of gutters intercepting 37% of the precipitation. Soil samples were taken on three soil depths (0-10, 40-50, 90-100 cm) and five dates (27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17) over a year, including seasons with higher and lower rainfall; intended for molecular analysis. Another sampling (23/02/19) during the higher rainfall season was intended for the evaluation of bioindicators at three depths (0-10, 10-20, 40-50 cm). Due to project needs, a DNA quantification protocol was implemented with PicogreenTM, which was compared to other methods for validation. Changes in the structure of the bacterial and fungal community were evaluated through fingerprinting techniques (DGGE and T-RFLP). Abundances of 16S rRNA genes from bacteria and archaea, 18S rRNA from fungi and *nifH* from N-fixing bacteria were estimated by quantitative PCR. Bioindicators were evaluated through enzymatic activity of β -glucosidase, acid and alkaline phosphatase, soil respiration and microbial C biomass. Season and depth were structural factors of the bacterial and fungal communities; the effect of the reduction of rains was significant in the structuring of two sampled dates for the bacterial community (in higher and lower rainfall seasons). The abundance of 16S of archaea and 18S of fungi genes was reduced due to the reduction in rainfall on one of the sampled dates, the other genes showed no effect. Biomass and soil respiration did not show any treatment effect and only the second one showed depth effect. Enzymatic activities decreased with increasing depth whereas rainfall reduction led to increased activity, this effect was prominent on the surface for β -glucosidase and acid phosphatase and in depth for alkaline phosphatase. In this study, the effect of reduced rainfall on microbial communities was verified, although to a lesser extent than seasonal variations and depth, which highlights that more studies are needed to better understand the impact of rain reduction on soil microbiological functioning.

Keywords: Rainfall reduction, Eucalyptus, qPCR, Fingerprinting, Enzymatic activity

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A temática das mudanças climáticas se mostra extremamente relevante para a sociedade atual, o que é verificado no meio popular através de filmes como “Uma Verdade Inconveniente”, do surgimento de personalidades como a ativista ambiental Greta Thunberg e da inclusão da pauta da crise climática no Fórum Econômico Mundial (Davos, 2020). No meio acadêmico, podemos observar a evolução da relevância do tema através de uma busca no sistema de base de dados Scopus; o qual possui 935 documentos relacionados as palavras *climate* e *change* no ano de 1990, 3.649 no ano 2000 e 32.786 em 2019. Esses resultados mostram que o tema começou a ganhar força a partir da década de noventa e vêm em uma crescente exponencial. Dentre eles, temos diversos documentos do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), órgão ligado a Organização das Nações Unidas (ONU) que apresentam dados de mudanças já observadas e também modelos de previsão para os próximos anos. Essas mudanças são atribuídas principalmente pelo aumento das emissões de gases do efeito estufa (GEE) devido a ações antrópicas.

Dentre os efeitos causados pelas mudanças climáticas na América Latina, nós temos efeitos diretos como alterações da temperatura média anual, aumento do nível do mar, da precipitação e na intensidade e a ocorrência de eventos extremos. Em consequência dessas mudanças nós podemos ter impactos indiretos como a extinção de espécies, principalmente nas regiões tropicais; aumento na incidência de pragas e doenças de plantas; e alterações na produtividade agrícola (MAGRIN et al., 2014).

Uma redução da precipitação, ou uma mudança no regime das chuvas, podem afetar seriamente a agricultura. Um dos cultivos que pode ser afetado é o do eucalipto (*Eucalyptus grandis*), o qual responde diretamente à mudanças nas precipitações anual. Sua produção pode variar de 1,5 a 2,2 toneladas por hectare ao ano com uma mudança de 100 mm na precipitação anual. Desse modo uma redução de chuvas afetaria a produtividade desse cultivo, sendo necessárias adoções de novas estratégias para manter a produção no patamar atual (BINKLEY et al., 2017; STAPE et al., 2010). Atualmente, o cultivo de eucalipto possui papel central na silvicultura brasileira, ocupando 73,3% da área de árvores plantadas, o que corresponde a 7,5 milhões de hectares (IBGE, 2019; IBÁ, 2019). O Brasil apresentou uma produtividade de 36,0 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ em 2018 colocando-o como líder mundial nesse quesito. Apesar do impacto das mudanças climáticas, a produtividade do eucalipto apresentou um crescimento de 0,5%, o que foi relacionado aos investimentos em pesquisas (IBÁ, 2019).

O desenvolvimento das plantas depende da interação com o solo para a obtenção de seus nutrientes (BÜNEMANN et al., 2018). A redução da precipitação afeta diretamente o solo, alterando aspectos químicos, físicos e biológicos que influenciam a interface solo planta. Ao pensarmos no aspecto biológico, não podemos deixar de ressaltar a importância dos micro-organismos, os quais são responsáveis por ciclos biogeoquímicos, disponibilização de nutrientes e relações ecológicas com outras formas de vida. Esses organismos são representados por três grandes grupos: os fungos, as bactérias e as arqueias, e podem ter a sua estrutura e dinâmica afetadas pela redução do volume de chuvas.

Já existem estudos dos efeitos do estresse hídrico sobre a comunidade microbiana, destacando alterações em seus aspectos funcionais e também com a composição (BOUSKILL et al., 2016; PREECE et al., 2019). Prevê-se que a mudança climática altere a quantidade e as formas de carbono alocado na parte inferior da planta, que pode causar mudanças na composição das comunidades microbianas do solo (CHURCHLAND; GRAYSTON, 2014). No entanto, mesmo com esses estudos, existem lacunas que comprometem a boa compreensão dos efeitos de uma possível redução hídrica prolongada. Entre essas lacunas podemos exemplificar o enfoque em estresses de curtos períodos de

tempo e em condições *in vitro*, o baixo número de trabalhos nas condições climáticas do Brasil e as diferentes abordagens que podem ser utilizadas.

É importante salientar que a maioria dos trabalhos avaliando a comunidade microbiana é focada nas camadas mais superficiais do solo (0-10 cm), onde reside a maior atividade microbiológica. Porém, as camadas mais profundas possuem um ambiente distinto, com uma diversidade e atividade das comunidades microbianas que podem ser menos sensíveis às consequências climáticas. Exemplos de trabalhos realizados em gradientes verticais do solo demonstraram que as atividades microbiológicas profundas são mais estáveis que as observadas nas camadas mais superficiais (EILERS et al., 2012; LOEPPMANN et al., 2016), o que pode acarretar em consequências importantes na manutenção de certas funções do solo em casos de mudança climática.

O eucalipto é uma árvore com raízes muito profundas que podem chegar a 17 m e atingir o lençol freático (GERMON et al., 2019). Nos últimos anos, o interesse da comunidade científica sobre comunidades microbianas em solo profundos aumentou fortemente (GOCKE et al., 2017; LI et al., 2014; PEREIRA et al., 2017; ZHENG et al., 2017), embora a maioria dos estudos sobre a comunidade microbiana atuais ainda foquem na camada 0-20 cm (HE et al., 2017; OCHOA-HUESO et al., 2018; RAHMAN et al., 2018; TRIVEDI et al., 2019).

Este trabalho busca avaliar os efeitos da redução hídrica do solo sobre a comunidade microbiana *in loco*, em uma área experimental com cultivo de eucalipto sobre influência de uma redução de chuvas desde o ano de 2010. Optou-se por avaliar as comunidades microbianas em um gradiente vertical até 1 m, possibilitando avaliar tanto um efeito da profundidade como a dinâmica temporal (com amostras abrangendo períodos de maior e menor precipitação); o que não seria possível caso opta-se por avaliar maiores profundidades devido as limitações de amostragem. Utilizou-se técnicas moleculares para acessar a estrutura microbiana e quantificar comunidades totais e funcionais; e técnicas mais convencionais para avaliar a funcionalidade; buscando-se assim complementar as lacunas existentes nos estudos feitos sobre essa temática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultivo de eucalipto no Brasil e impacto das mudanças climáticas

As plantações de eucaliptos representam 15% das plantações florestais do mundo, cobrindo cerca de 25 milhões de hectares (BORRALHO et al., 2018). No Brasil, essas plantações ocupam 7,5 milhões de hectares o que representa 73,3% da área das plantações florestais brasileiras (IBGE, 2019) e 75% do consumo de madeira para uso industrial (IBÁ, 2019). As plantações de eucalipto desempenham um papel importante no suprimento de celulose, papel e geração de energia no Brasil, que representou 1,3% do PIB do país, além de 2,0 milhões de empregos diretos e indiretos em 2018 (IBÁ, 2019).

Em regiões tropicais e subtropicais, as plantações industriais de eucalipto, com um rápido crescimento, participam no armazenamento de carbono atmosférico e ajudam a reduzir a exploração de florestas naturais fornecendo uma proporção crescente da demanda mundial em madeira. Essas florestas de grande interesse econômico têm capacidade para produzir mais de $60 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de madeira (OLIVEIRA et al., 1999) e as plantações de eucalipto no Brasil estão entre as florestas mais produtivas do mundo (LUYSSAERT et al., 2007). Um estudo baseado no *Global Forest Products Model* prevê um aumento de 20% na demanda mundial de madeira até 2060 (BUONGIORNO; GILLES, 2003), sugerindo a necessidade de adaptar as condições de produção do eucalipto, tendo em conta as restrições incluindo às do clima, para atender a essa alta demanda.

No Brasil, a maioria das plantações de eucalipto são estabelecidas em solos com baixa fertilidade e submetidas a períodos de seca de até 6 meses (GONÇALVES et al., 2013; SILVEIRA et al., 1995). Nas regiões tropicais e subtropicais, a produtividade das plantações de eucalipto gerenciadas intensivamente é controlada principalmente pela disponibilidade de água no solo (GONÇALVES et al., 2013; SMETHURST, 2010).

O manejo das plantações de eucalipto de crescimento rápido deve ser adaptado no futuro a condições de seca mais frequentes para evitar a mortalidade das árvores (BATTIE-LACLAU et al., 2014; WHITE et al., 2009). Apesar de que as projeções sobre o futuro das precipitações ainda sejam difíceis de prever em nível local, estudos mostraram que o aquecimento global será associado a uma intensificação das estações secas em muitas partes do globo (SOLOMON et al., 2009) e, especialmente, em regiões subtropicais já sujeitas a secas severas, como o Brasil, ilustrado na Figura 1. Essas previsões mostram que um grande número de regiões subtropicais, localizadas em todos os continentes, será capaz de ter estações até 10% mais secas, por grau de aquecimento. As reduções de precipitação durante as estações secas na África, sul da Europa ou leste da Austrália seriam de 20% para um aquecimento de 2°C e as previstas para a América do Norte, leste da América do Sul ou África Austral seriam de 10%. Em um estudo publicado em 2008, Sheffield e Wood (2008) mostraram que, globalmente, a severidade das secas (definida com base no déficit hídrico no solo) pode dobrar em 2100 em todo o mundo. Da mesma forma, a duração das secas deverá aumentar em cerca de 60% até 2100. Eles também preveem um aumento na frequência de estações secas curtas (4-6 meses) de mais de 100% e de longos períodos de seca (> 12 meses) de quase 200%. O aumento na duração e na frequência das secas até 2100 varia em todo o mundo, mas os maiores aumentos geralmente são observados nas regiões tropicais e subtropicais. Uma diminuição na precipitação associada a um aumento na duração e na frequência dos períodos secos pode, a longo prazo, ter muitas consequências sobre os plantios de eucalipto.

Figura 1. Previsões médias de mudanças na distribuição global de chuvas. As variações de precipitação são expressas como uma variação percentual da precipitação por grau de aquecimento. São feitas previsões para variações decadais da precipitação de 1900-1950 como período de referência (Solomon et al., 2009).

Neste contexto, é importante entender melhor a resposta dos ecossistemas florestais e de sua capacidade de adaptação às condições de seca. O manejo dessas plantações florestais deverá adaptar-se às condições de secas mais frequentes no futuro para evitar a mortalidade de árvores. A seleção de clones e híbridos tolerantes será necessária para reduzir as necessidades de água das árvores, além de um possível ajuste na densidade de plantio, regime de fertilização, duração da rotação e levando em consideração o manejo que possa favorecer as atividades biológicas do solo que podem desempenhar um papel fundamental na adaptação ao estresse hídrico, em particular promovendo a nutrição das árvores. De acordo com Beier et al. (2012), a maioria dos experimentos testando o efeito da exclusão de chuvas em todo o mundo foi realizada em pastagens (46%) e florestas (30%) localizadas em latitudes médias (30-60°). Houve uma sub-representação clara de experimentos em locais com altos índices de precipitação excedendo 1500 mm ano⁻¹ (6%).

2.2. Impacto de um estresse hídrico sobre o funcionamento biológico do solo

Em ecologia um dos fatores mais fortes atuando na distribuição das espécies é a disponibilidade de água. Alterações no regime de precipitação são esperadas em cenários futuros, causando um efeito direto sobre as comunidades, distribuição de espécies e funções ecológicas do ecossistema (ENGELBRECHT et al., 2007). Os efeitos das alterações no regime de chuvas sobre as comunidades de plantas foram relatados em inúmeros trabalhos (WILCOX et al., 2015), observando-se mudanças na produção primária, diversidade e o aproveitamento dos recursos disponíveis (JENTSCH et al., 2011; NA et al., 2019; WILCOX et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Em alguns desses trabalhos foram estudados os efeitos tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, presente no solo, obtendo-se efeitos contrastantes entre as duas partes (WILCOX et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

O solo é um sistema extremamente complexo e dinâmico, composto por inúmeras interações entre fatores bióticos e abióticos (FIERER, 2017; HARTEMINK, 2016). Dentre essas interações a relação entre as plantas e os micro-organismos presentes no solo frente ao efeito do estresse hídrico têm sido um objeto constante de estudo (FRY et al., 2018; HICKS et al., 2018; MANZONI et al., 2014). Os micro-organismos do solo (bactérias, arqueas, fungos, protistas e outros micróbios eucariotos) possuem um papel essencial para a saúde do solo (CARDOSO et al., 2013), participando em processos como a estruturação do solo, disponibilização e absorção de nutrientes, modulação dos ciclos biogeoquímicos e outros serviços ecossistêmicos influenciando direta e indiretamente a saúde de plantas e animais no ambiente terrestre (FIERER, 2017; MADSEN, 2011; TRIVEDI et al., 2019).

2.2.1. Impacto sobre as comunidades microbianas

A restrição hídrica afeta a comunidade microbiana de maneira direta e indireta. Um exemplo de efeito direto é a redução do conteúdo de água no solo, que compromete a mobilidade dos solutos que servem de substrato para os micro-organismos decompositores, afetando a produção de biomassa por eles. Um efeito indireto seria a redução da produção primária das plantas, devido à restrição hídrica, e como consequência uma redução do carbono e nitrogênio liberados na forma orgânica que seriam utilizados pelos micro-organismos (ILSTEDT; NORDGREN; MALMER, 2000; MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012; REN et al., 2018). O potencial matricial da água no solo diminui sob condições de estresse hídrico. Essa diminuição provoca alterações fisiológicas nos micro-organismos como alterações no metabolismo visando o acúmulo de solutos para o equilíbrio do potencial osmótico com o meio externo que podem levar a alterações nos fluxos de nutrientes como o N no solo (SCHIMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007).

Os organismos do solo respondem diferentemente ao estresse hídrico, por exemplo, com a redução da conectividade entre os poros do solo as bactérias têm sua mobilidade diminuída, assim como a difusão de substratos o que pode acarretar em mudanças na comunidade bacteriana (CARSON et al., 2010). Já os fungos são considerados mais adaptados a condições de baixa umidade devido a sua maior capacidade em acumular solutos que possibilitam o equilíbrio osmótico das suas células e pelas estruturas filamentosas que exploraram o substrato de maneira mais efetiva (MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012; OCHOA-HUESO et al., 2018). Em condições sem estresses ou distúrbios ocorre uma predominância de grupos microbianos competitivos. Quando ocorre uma condição de estresse, como a diminuição da umidade, há um favorecimento do crescimento de grupos microbianos com características capazes de tolerá-lo. Já condições de distúrbios em que ocorre apenas um estresse momentâneo, há um favorecimento de grupos ruderais, com crescimento rápido (FIERER, 2017).

No estudo de Ren et al. (2018) tanto os fungos quanto as bactérias responderam negativamente a restrição hídrica, no entanto a redução só foi significativa no caso das bactérias. Em relação aos grupos microbianos a abundância das Proteobactérias decaem com a redução das chuvas, enquanto que as Gemmatimonadetes aumentam com a restrição. As Actinobactérias, Acidobactérias e fungos micorrízicos arbusculares não foram afetados pela redução das chuvas (REN et al., 2018).

Yuste et al. (2011) verificaram que a diversidade de fungos é menos sensível às mudanças sazonais na umidade, temperatura e atividade das plantas do que a diversidade bacteriana nos ecossistemas naturais do Mediterrâneo. Hawkes et al. (2011) constataram que a diversidade de fungos estimada em amostras de solo coletadas em pradarias aumentou em períodos secos, sugerindo que o estresse hídrico modera a competição. Em outro estudo, com exclusão de chuvas, Cregger et al. (2012) avaliaram a abundância de fungos em uma floresta de Pinus (*Pinus edulis*) e Juniperus (*Juniperus monosperma*), localizada em um ecossistema semi-árido com uma estação de monção que concentra mais da metade da precipitação anual (368 mm). Neste estudo foi observada uma maior abundância de fungos durante a época chuvosa nas amostras submetidas à exclusão de chuvas, sugerindo que os fungos do solo podem ser limitados pela redução de chuvas (CREGGER et al., 2012). Tal efeito pode resultar em uma diminuição das atividades de fungos, como a degradação do substrato de carbono. Em relação à simbiose ectomicorrízica, um estudo realizado em uma floresta mediterrânea de carvalhos mostrou que o tratamento de redução de chuvas leva a mudanças na composição da comunidade de ectomicorrízica, mas não afeta a riqueza global (RICHARD et al., 2011).

Em um estudo da estrutura da comunidade bacteriana da camada 0-5 cm de um solo sob 6 meses de um estresse hídrico constatou-se, através de técnicas moleculares de análise do DNA e RNA, alterações na comunidade microbiana total (FELSMANN et al., 2015). As mudanças mais significativas foram observadas sobre a comunidade ativa a qual apresentou diferenças significativas na abundância da atividade de alguns grupos específicos, bem abaixo do nível de filo; mas em geral foi observado uma redução no grupo das Acidobactérias e um aumento nas Actinobactérias, as quais produzem filamentos que facilitam seu crescimento em condições com pouca água. Esses resultados diferem dos observados na metanálise apresentada anteriormente, elucidando a necessidade de novos estudos que ajudem a explicar a capacidade da microbiota do solo em resistir as estações secas, através da modulação da estrutura da comunidade presente (FELSMANN et al., 2015).

2.2.2. Impacto sobre comunidades funcionais ligadas ao ciclo N

O nitrogênio (N) é um elemento essencial a todos micro-organismos, sendo o quarto mais abundante da biomassa celular, compondo estruturas vitais para o funcionamento da célula como proteínas e ácidos nucleicos. O gás dinitrogênio (N₂) é o maior reservatório de N disponível do planeta, porém ele só é biologicamente acessível por um grupo de micro-organismos que realiza a fixação biológica do N. Até o início do século XX o ser humano dependeu desses micro-organismos para a transformação do N₂, mas em 1909, o advento do processo Haber-Bösch possibilitou fixação industrial do N₂ em amônia (NH₃). Com esse processo a produção agrícola mundial aumentou mais do que quatro vezes, devido a utilização de fertilizantes minerais. Porém essa e outras formas antropogênicas de emissão do N causaram um desequilíbrio na regulação do ciclo do N contribuindo para o aquecimento global, eutrofização de ambientes entre outros. Para compreender as consequências dessas mudanças é necessário compreender a dinâmica desse ciclo. Que pode ser dividido em 6 processos (Figura 2): fixação biológica do N, amonificação, nitrificação, desnitrificação e oxidação anaeróbica do amônio (annamox) (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; STEIN; KLOTZ, 2016).

A fixação biológica do N é o processo em que N_2 é convertido em NH_4^+ , através da metaloenzima nitrogenase, que é difundida por bactérias e arqueas; um gene marcador de micro-organismos fixadores do N é o *nifH*, que codifica a proteína nitrogenase redutase (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; ZEHR et al., 2003). A assimilação é o processo pelo qual a amônia é convertida em N orgânico (biomassa). A amonificação, também denominada mineralização, é o processo pelo qual o N orgânico é convertido em NH_4^+ (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

O processo da nitrificação é realizado por 3 processos que abrangem três grupos de micro-organismos: primeiro a nitrificação que é realizada pelas arqueas (AOA) e bactérias (AOB) oxidantes de amônio (NH_4^+), que oxidam o amônio em nitrito (NO_2^-), com utilização da enzima amônia monooxigenase, sendo que o gene que codifica essa enzima é o *amo*; o segundo é a nitratação em que bactérias oxidam o nitrito em nitrato (NO_3^-) realizada pela enzima nitrito oxidoreductase (*nxr*), e por último temos o processo do *comammox*, em que bactérias são capazes de realizar todo o processo de oxidação da amônio por um único indivíduo. O processo do *comammox* foi descoberto recentemente, em bactérias do gênero *Nitrospira*, contraindo a concepção anterior de que a oxidação do amônio e do nitrito era feita obrigatoriamente por dois grupos distintos de micro-organismos. Já existem estudos relatando que esses micro-organismos são onipresentes no solo, porém em menor abundância que os nitrificadores tradicionais. Vale ressaltar que os trabalhos sobre este grupo são recentes, sendo necessários mais estudos para um maior entendimento de suas funções e relações (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; STEIN; KLOTZ, 2016; VAN KESSEL et al., 2015; XU et al., 2020).

A desnitrificação é o processo de respiração anaeróbica do nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), e óxido nitroso (N_2O) até dinitrogênio (N_2). O nitrato é reduzido a nitrito por eucariotos, bactérias e arqueas, sendo a reação catalisada pela enzima nitrato redutase (*nap* e *nar*). O nitrito é reduzido a óxido nítrico por enzimas duas enzimas nitrito redutases, que são codificadas pelos genes *nirS* e *nirK* que são frequentemente utilizados em estudos ambientais para avaliar o processo de desnitrificação. O óxido nítrico é reduzido a óxido nitroso, um importante gás do efeito estufa, por enzimas óxido redutases (*nor*). Por último temos a redução do óxido nitroso ao gás dinitrogênio, a principal reação de abatimento do óxido nitroso, sendo que a reação é catalisada pela enzima óxido nitroso redutase (*nos*) (KANDELER et al., 2011; KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014; STEIN; KLOTZ, 2016).

Por último temos o processo da oxidação anaeróbica do amônio ao gás dinitrogênio (*anammox*), utilizando o NO_2^- comoceptor final de elétrons, este processo foi relatado a menos de 30 anos, (MULDER et al., 1995; VAN DE GRAAF et al., 1996), inicialmente verificado em ambientes marinhos e posteriormente em solos agrícolas. Por depender de compostos de N nas formas oxidadas e reduzidas, uma das teorias é de que ele ocorre na interface entre ambientes óxidos e anóxicos, que podem ser encontrados em ambientes alagados e em *hotspots* próximos a rizosfera (NIE et al., 2019). A *anammox* é realizada por bactérias que possuem a enzima hidrazina sintase (*hzs*), e estima-se que cerca de 5-10% do N aplicado via fertilizantes seja perdido através desse processo, mas ainda se mostram necessários novos estudos para corroborar essa estimativa e também para elucidar as contribuições desse processo na escala global e nos diferentes ecossistemas (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018; LU et al., 2018; NIE et al., 2019).

O conhecimento dos genes envolvidos nas diferentes etapas da transformação do nitrogênio permite o uso de ferramentas moleculares para monitorar as comunidades funcionais envolvidas (Figura 2).

Figura 2. Principais processos no ciclo do N e os respectivos genes envolvidos nas reações

A redução da biodiversidade de um sistema, em função da seca por exemplo, afeta a comunidade nele presente, sendo uma das consequências, alterações nas funções ecológicas desempenhadas. Entre essas consequências temos as alterações nos processos de ciclagem dos nutrientes, como a redução da decomposição da liteira e incorporação do nitrogênio (N) e um aumento das emissões de óxido nitroso (N_2O), um importante gás do efeito estufa (WAGG et al., 2014).

A chuva é um fator importante nos processos que ocorrem no solo. Seu conteúdo afeta a aeração, e como consequência, processos microbianos de consumo e produção dos gases carbônico (CO_2), óxido nitroso (N_2O) que são gases do efeito estufa. Ao simular uma restrição hídrica foi observado que as emissões de CO_2 e óxido nítrico (NO) em superfície não sofreram alterações, já o N_2O sofreu uma redução nas emissões. Tais resultados mostram que a produção do N_2O é sensível a diminuição dos volumes de chuvas, indicando uma relação direta com a aeração do solo, a desnitrificação (DAVIDSON; ISHIDA; NEPSTAD, 2004).

A redução da umidade do solo poderia levar a um aumento da concentração do NH_3^+ ou NH_4^+ (forma mais comum em solos ácidos) que favoreceria as comunidades oxidantes de amônio. No entanto também pode haver uma redução da espessura dos filmes de água, dificultando a disponibilidade do mesmo (BELLO et al., 2019).

Em um estudo que abordou o efeito da irrigação na abundância de micro-organismos ligados ao ciclo do N em uma área de produção de eucalipto ao longo das quatro estações, observou-se que a irrigação aumentou a abundância de AOB, mas não afetou as AOA nem a abundância do gene *nosZ* (desnitrificantes) de modo que esses resultados demonstraram que as AOB respondem positivamente ao aumento da água disponível. Quanto a sazonalidade não foram observados efeitos na abundância dos genes relacionados às comunidades de AOA e AOB, mas sim para o gene *nosZ* (MARTINS et al., 2015).

Já outro trabalho analisou o efeito do aumento da aridez no ciclo do N. Observou-se que com o aumento da aridez ocorre uma redução linear nos processos de mineralização e imobilização do N; também foi observado um efeito de aumento e posterior declínio no processo de nitrificação (abundância AOA). Tal aumento foi relacionado a uma possível diminuição da competição com as plantas pelo amônio, a posterior queda foi associada à redução do processo de mineralização, diminuindo assim os recursos do grupo das AOA (KOU et al., 2018).

Um terceiro estudo avaliou o efeito do estresse hídrico em condições *in vitro* com diferentes concentrações de NH_4^+ , observou que tanto a comunidade de AOA quanto de AOB respondem negativamente a diminuição do potencial mátrico de maneira independente a concentração da NH_4^+ , sendo que a comunidade de AOA se mostrou mais sensível ao estresse. Tais resultados colocam em dúvida a teoria de que a modulação dessas comunidades em condições de estresse hídrico se dê pelas mudanças na disponibilidade e concentração do NH_4^+ (BELLO et al., 2019).

Na última década a compreensão do ciclo do N em diferentes ecossistemas, incluindo florestas e ambientes agrícolas aumentou muito, principalmente pelo crescimento do interesse em microbiologia microbiana e o rápido desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, ainda assim a compreensão sobre ecossistemas tropicais e subtropicais carece de informações (PAJARES; BOHANNAN, 2016), principalmente quanto ao efeito das mudanças climáticas.

2.2.3. Impacto sobre indicadores biológicos de qualidade do solo

O conceito de qualidade do solo foi definido como “a capacidade de um solo em funcionar dentro dos limites do ecossistema e do uso da terra de modo a sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas e dos animais” (DORAN; SAFLEY, 1997). A qualidade do solo é formada pelos fatores químicos, físicos e biológicos sendo estes definidos por várias características como o pH, matéria orgânica, capacidade de retenção de água, textura, respiração e biomassa microbiana dentre muitos outros. As características mais citadas na escolha de um bom indicador da qualidade de um solo são a necessidade que este esteja ligado a função ou processo ecossistêmico, possua amostragem e mensuração fácil, um baixo custo, seja sensível a perturbações como mudanças no manejo e tenha fácil interpretação (BÜNEMANN et al., 2018).

Os micro-organismos são um importante fator para a qualidade do solo, estando envolvidos nos processos ecossistêmicos da ciclagem do C, N e de outros nutrientes através de sua atividade. Dentre os indicadores que podem ser utilizados para avaliar a atividade microbiana nós temos a análise da biomassa microbiana, que permite, através de técnicas relativamente simples, avaliar o impacto de mudanças ambientais nos micro-organismos do solo podendo inclusive ser utilizada em conjunto ao método de respirometria; temos a mineralização do N, um processo relevante para o ecossistema ao fornecer nutrientes em formas absorvíveis e que se mostra sensível à mudanças; e a atividade enzimática, uma vez que as enzimas são responsáveis por catalisar as reações de degradação da matéria orgânica e promover a ciclagem de nutrientes, exemplos dessas enzimas são a β -glucosidase ligada a mineralização do C e a fosfatase ácida ligada a mineralização do fósforo (BÜNEMANN et al., 2018; MAHARJAN et al., 2017; MGANGA; RAZAVI; KUZUYAKOV, 2016; SCHLOTER; DILLY; MUNCH, 2003).

A biomassa microbiana é composta por todos os micro-organismos vivos menores que 10 μm , sendo dominada principalmente por fungos e bactérias que são responsáveis pelos principais fluxos de energia e nutrientes no solo (SCHLOTER; DILLY; MUNCH, 2003). Ela é considerada um bom indicativo da qualidade do solo devido a sua sensibilidade e boa correlação com outros indicadores (BÜNEMANN et al., 2018). Em uma metanálise feita por Ren et al. (2018) avaliou-se o impacto de restrições hídricas sobre a biomassa microbiana. Entre os resultados obtidos observou-se a redução da biomassa devido à restrição das chuvas. Influenciada principalmente pela intensidade da restrição, com um efeito de até 26,6%; o tipo de vegetação e o clima, com florestas de regiões úmidas sofrendo uma redução de 17,3%.

A atividade enzimática vêm sendo utilizada como uma ferramenta em experimentos para avaliar as respostas microbianas a mudanças climáticas, como alterações nas precipitações. Em experimentos realizados com a

manipulação da entrada de água no sistema observou-se uma grande resposta no potencial das atividades enzimáticas, no entanto essa resposta se mostrou variável, podendo aumentar ou diminuir com a imposição de uma restrição hídrica, o que pode ser explicado pelas condições experimentais. Uma vez que áreas alagadas com condições anaeróbicas possuem baixa atividade enzimática e a redução dessa umidade irá proporcionar uma maior aeração e consequentemente um aumento dessa atividade; em contrapartida um solo bem drenado com uma precipitação anual média responderá negativamente a uma restrição hídrica (HENRY, 2012).

No estudo de Li et al. (2018) a atividade enzimática extracelular de um solo sobre diferentes níveis de precipitação reduzida (-30%), regular (792,1 mm) e aumentada (+30%) foi avaliada. Observou-se que a atividade da β -glucosidase e da fosfatase ácida foram reduzidas em condições de menor precipitação, o que condiz com os resultados de Bastida et al. (2017) que também observou a redução da atividade dessas enzimas.

2.3. Impacto de um gradiente vertical ao longo de um perfil de solo sobre as comunidades microbianas

Os micro-organismos possuem um papel importante no solo; participando de ciclos biogeoquímicos, degradação de contaminantes e relações ecológicas. A maior parte dos estudos está concentrada apenas nas camadas mais superficiais do solo, que é onde de fato se concentra a maior parte da biomassa bacteriana, 33% desta, na zona 0-25 cm quando analisada até 200 cm. Existe uma quantidade considerável de micro-organismos ocupando as outras camadas, mesmo que de maneira esparsa. Ao longo da profundidade ocorre uma mudança na comunidade microbiana, relacionada muito mais com as mudanças nas disponibilidades de recursos como as fontes de carbono (C) do que a mudanças no pH ou aspectos físicos do solo como a textura e temperatura (FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a).

Mesmo que a abundância e a diversidade das comunidades microbianas diminuam em profundidade com as condições menos favoráveis para as atividades microbianas (EILERS et al., 2012), o interesse pelas comunidades microbianas nas camadas mais profundas do solo aumentou significativamente nos últimos anos com a publicação de muitos artigos sobre o assunto (GOCKE et al., 2017; LI et al., 2014; PEREIRA et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Alguns estudos mostraram comunidades microbianas abundantes e diversas de maneira inesperada nas camadas mais profundas do solo (DODDS et al., 1996; GOCKE et al., 2017; ZHENG et al., 2017). Embora a biomassa dos micro-organismos comumente diminua com a profundidade, o impacto das comunidades microbianas no funcionamento do ecossistema pode ser forte, com atividades enzimáticas específicas (normalizadas pela biomassa) mais intenso em profundidade que no solo superficial em alguns casos (STONE; DEFOREST; PLANTE, 2014).

Ao avaliar o efeito do manejo do cultivo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* e da profundidade sobre a estrutura da comunidade bacteriana, Pereira et al. (2017) observaram, através do uso da técnica de *qPCR*, que a abundância do gene 16S rRNA sofreu uma redução com o aumento da profundidade variando de $1,0E+10,1$ a $0,77E+10$ entre as camadas 0-100 e 700-800 cm, onde também foi constatado que na camada superficial do solo não houve diferenças na abundância do gene entre os tratamentos, porém em profundidade constatou-se o efeito dos diferentes tipos de manejo sobre esta abundância. Através do sequenciamento do gene constatou-se diferenças na estrutura e composição da comunidade microbiana em resposta a profundidade e aos diferentes tipos de manejo; observou-se que os filos Acidobacteria e Verrucomicrobia se mostraram proeminentes na camada 0-100 cm, enquanto os filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes apresentaram um aumento na abundância relativa. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que essas alterações na comunidade se devem provavelmente à limitação da disponibilidade de

C de modo que em subsuperfície ocorre uma seleção de grupos bacterianos específicos capazes de sobreviver em condições de poucos recursos disponíveis.

Estudos avaliaram a atividade microbiana ao longo do perfil do solo, ao comparar sistemas de floresta, cultivo orgânico e convencional em Maharjan et al. (2017), ou compararam o plantio convencional com o plantio direto em Hsiao et al. (2018). Em ambos os trabalhos observou-se uma maior atividade microbiana em superfície, representada tanto pela maior biomassa quanto pela maior atividade enzimática, que decai com o aumento da profundidade. Ao observar o efeito do manejo sobre esses indicadores, Maharjan et al. (2017) observou que a biomassa foi afetada significativamente em superfície, o que não ocorreu em subsuperfície; o mesmo sendo observado para as atividades enzimáticas, no entanto para o sistema orgânico a fosfatase ácida apresentou um aumento da atividade com a profundidade, o que foi relacionado pelos autores a um investimento por parte das plantas e dos micro-organismos para a aquisição de P.

Todos esses estudos mostram o interesse de estudar comunidades microbianas ao longo de um perfil do solo e não apenas nas camadas superficiais (0-10 cm) do solo, e ainda mais no caso do estudo do impacto de efeito das mudanças climáticas, os efeitos podem ser diferentes entre a superfície e as camadas mais profundas do solo (menos sensíveis a distúrbios da superfície).

2.4. Metodologias para estudar a diversidade e funcionalidade microbiana

2.4.1. Metodologias de quantificação do DNA

Após a extração, a quantificação do DNA é uma etapa fundamental dos métodos independentes de cultivo baseados em técnicas moleculares, interferindo diretamente no manuseio do DNA (e.g. digestão, sequenciamento, clonagem, etc.) e nas análises moleculares (e.g. PCR, *q*PCR). Dentre as metodologias de quantificação mais comuns nós temos os métodos por espectrofotometria UV, pela fluorescência emitida através de corantes do DNA como o Picogreen™ e através da eletroforese em gel de agarose (LEE; MCCORD; BUEL, 2014).

2.4.1.1. Quantificação por espectrofotometria UV

A quantificação por espectrofotometria UV é baseada no princípio de que os ácidos nucleicos absorvem a luz ultravioleta com um padrão específico. O NanoDrop™ é um dos instrumentos mais conhecidos neste tipo de quantificação. Neste equipamento a amostra de DNA é exposta a luz UV no comprimento de onda de 260 nm e então um detector mede a luz que não foi absorvida pela amostra, quanto maior a luz absorvida pela amostra, maior a concentração de DNA da amostra. Uma desvantagem desse método é que moléculas como fenol e guanidina, comumente utilizadas no processo de extração do DNA, também absorvem a luz UV afetando a quantificação (DESJARDINS; CONKLIN, 2010). Outras moléculas também podem afetar a quantificação como proteínas e ácidos húmicos, que são comumente encontrados no DNA extraído do solo (WANG; FUJII, 2011). Vale ressaltar que a contaminação por essas substâncias pode ser verificada pela análise de comprimentos de onda específicos, uma vez que elas também possuem um padrão de absorção específico (THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC, 2010).

2.4.1.2. Quantificação por fluorimetria

A quantificação por espectro-fluorimetria envolve a utilização de um fluorímetro e um corante intercalante de DNA; seu princípio é baseado na leitura da fluorescência emitida pelo corante ligado ao DNA, após a excitação devido a emissão de luz com comprimento de onda específico. Dentre os corantes passíveis de serem utilizados existem o brometo de etídio, o SYBR Green I e o PicoGreen (LEE; MCCORD; BUEL, 2014). O primeiro possui como desvantagens a alta fluorescência intrínseca, também se intercalam com RNA e DNA fita única (ssDNA), que somado ao seu potencial mutagênico o tornou preterido aos outros corantes. Os dois últimos são corantes formados por moléculas de cianina tipo assimétrica, sendo que o SYBR Green I foi adotado para utilização em reações de *q*PCR, devido a sua capacidade em resistir aos ciclos de alta temperatura da reação de *q*PCR. Já o PicoGreen foi adotado para o uso da quantificação do DNA dupla-fita (dsDNA) devido à sua especificidade e sensibilidade (BLOTTA et al., 2005; SINGER et al., 1997).

2.4.1.3. Quantificação por eletroforese em gel de agarose

Na quantificação por eletroforese em gel de agarose o DNA é marcado com um corante, como brometo de etídio ou SYBR GREEN I, e então carregado no gel em conjunto com um DNA padrão com concentração conhecida, submetendo a eletroforese em seguida. Após o processo é feita a leitura sob luz UV, registro, e análise da imagem obtida que pode ser feita a olho ou utilizando softwares como o ImageJ. Dentre as vantagens desse método podemos destacar a possibilidade de se observar a qualidade do DNA, em contrapartida o tempo gasto e a alta quantidade de DNA necessária podem ser um fator limitante para aplicação da técnica (LEE; MCCORD; BUEL, 2014).

2.4.2. Metodologias moleculares

2.4.2.1. Metodologias de *fingerprinting* (T-RFLP/DGGE)

As técnicas moleculares de DNA-*fingerprinting* são ferramentas que fornecem de maneira rápida informações sobre o perfil da comunidade microbiana de diversos ambientes, (AZZIZ et al., 2017; KIM; LIM; LEE, 2013). Dentre as técnicas disponíveis existem o Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*), Análise Automatizada do Espaço Ribossomal Intergênico (ARISA - *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), e o Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Terminais De Restrição (T-RFLP - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*). As técnicas de *fingerprinting* são baseadas nas diferenças filogenéticas entre as espécies para a sequência de DNA de um gene marcador (NOCKER; BURR; CAMPER, 2007). Uma das principais limitações das técnicas de DNA-*fingerprinting* é que elas não fornecem informação taxonômica direta, de modo que informações sobre diversidade podem ser subestimadas (FIERER; JACKSON, 2006; VAN DORST et al., 2014). Já o sequenciamento de alto rendimento (HTS - *High-throughput sequencing*) fornece informações mais detalhadas e fidedignas. Nos últimos anos houve uma redução do custo do HTS, mas ele ainda é elevado, o que pode torná-lo inviável dependendo do número de amostras a serem analisadas (GEISEN et al., 2019; RAMETTE, 2009). Mesmo com essas limitações as técnicas de

fingerprinting ainda vêm sendo adotadas (AZZIZ et al., 2017; GU et al., 2017) e se mostram uma alternativa de menor custo para analisar mudanças na estrutura microbiana.

O T-RFLP é uma técnica inicialmente desenvolvida por Liu et al. (1997) e se baseia extração do DNA, seguida da reação de PCR do gene alvo utilizando um primer marcado com fluoróforo. Posteriormente é feita uma digestão com enzimas de restrição. Como os *amplicons* possuem diferentes sequências, a posição do sítio de ligação da enzima irá variar, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. O tamanho dos fragmentos são então determinados por eletroforese em um sequenciador automático, o qual possui um sensor que detecta quando a fluorescência é emitida. Ao final é gerada uma matriz com os tamanhos e a intensidade de cada fragmento, em que os tamanhos podem ser organizados em OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) sendo que a intensidade representará a abundância dessa OTU. A partir dessa matriz de dados geradas é possível realizar as análises para determinação da estrutura da comunidade microbiana (DICKIE; FITZJOHN, 2007; LIU et al., 1997).

Na DGGE fragmentos de tamanhos semelhantes, mas com sequências diferentes são separados por eletroforese em um gradiente desnaturante. O método consiste na extração do DNA, reação de PCR utilizando um grampo GC na posição 5' em um dos primers para impedir a total separação da dupla fita. A migração dos *amplicons* é feita sobre influência de uma corrente elétrica. Ao atingir a posição do gradiente no gel em que as fitas se separam a mobilidade dele decai drasticamente, possibilitando a formação do perfil de bandas do DGGE de acordo com o conteúdo GC dos amplicons (LAMBAIS et al., 2005; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2009).

2.4.2.2. Quantitative PCR (qPCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*qPCR*) é um método preciso para detecção e quantificação de ácidos nucleicos em uma amostra. Enquanto as técnicas de *fingerprinting*: DGGE e T-RFLP, nas quais fragmentos de PCR de diferentes sequências e/ou tamanhos são separados pela mobilidade em gel fornecem padrões que refletem a diversidade da comunidade microbiana; a *qPCR* permite detectar e quantificar em números absolutos a presença de uma sequência alvo, possibilitando inferir mais profundamente mudanças na estrutura da comunidade microbiana. A *qPCR* monitora a amplificação do DNA em tempo real, através da detecção da fluorescência liberada pela ligação de moléculas, como o SYBR® Green, aos amplicons formados a cada ciclo da PCR. Ao final da reação teremos um gráfico da fluorescência emitida pelo número de ciclos, com o qual é possível determinar o valor de *threshold* (CT). Este valor representa o número de ciclos necessários para atingir uma determinada concentração de amplicons (monitorada pela fluorescência), dentro da fase exponencial da reação. Através da correlação entre o valor CT da amostra com uma curva padrão entre os valores CT e concentrações conhecidas da sequência alvo é possível determinar a concentração inicial dessa sequência na amostra analisada (KIM; LIM; LEE, 2013). Através da técnica de *qPCR* é possível determinar a quantidade de um gene alvo por grama de solo, podendo ser utilizada para quantificar comunidades gerais de bactérias, arqueias e fungos; através dos genes 16S e 18S rRNA e também de comunidades funcionais através de genes como o *nirK* e *amoA*. Como exemplos podemos citar o trabalho de Jones et al. (2018) que avaliou a abundância do gene *amoA*, ligado à nitrificação, ao longo do perfil do solo e em Ren et al. (2018) avaliando o efeito de uma restrição hídrica na abundância das comunidades de fungos e bactérias.

3. HIPÓTESES

O estresse hídrico prolongado altera a estrutura da comunidade de fungos e bactérias, reduz a abundância das comunidades de fungos, arqueias, bactérias totais e as bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio; e reduz atributos microbianos (biomassa microbiana, respiração basal e atividade enzimática).

O efeito do estresse hídrico prolongado sobre a estrutura e a abundância e das comunidades microbianas é mais proeminente durante épocas úmidas em relação às secas.

O efeito do estresse hídrico prolongado é mais intenso na superfície, que está mais sujeita a mudanças climáticas do que em profundidade, onde o ecossistema é mais estável.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar a resposta das comunidades microbianas do solo quando submetida a um estresse hídrico prolongado em uma área de cultivo de *Eucalyptus grandis*.

4.2. Objetivos específicos

I- Avaliar o efeito do estresse hídrico prolongado sobre a estrutura da comunidade fúngica e bacteriana em diferentes épocas (secas e úmidas) ao longo de um gradiente vertical do solo.

II - Avaliar o efeito desse estresse sobre a abundância dos genes 16S rRNA de bactérias, 18S rRNA de fungos, 16S rRNA de arqueias; e comunidades funcionais envolvidas no ciclo do N (nitrificação, desnitrificação e fixação biológica do N) em diferentes épocas (secas e úmidas).

III- Avaliar o efeito desse estresse em indicadores de atividade microbiana do solo (atividade enzimática, biomassa microbiana e respiração basal) em uma época úmida.

5. METODOLOGIAS

5.1. Área experimental

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga, pertencente a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - Universidade de São Paulo (USP). A estação está localizada no município de Itatinga, SP, Brasil nas coordenadas 23°02' S e 48°38' O, com 850 m de altitude e é caracterizada por um relevo suavemente ondulado. A precipitação média anual nos últimos 15 anos foi de 1390 mm (74% concentrada de outubro a maio), temperatura e umidade relativa média anual foram de 20°C e 74% respectivamente. A região possui um clima denominado Cwa (subtropical úmido com inverno seco) segundo a classificação de Köppen (GERMON et al., 2019; PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007). O solo é caracterizado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico A, de textura média (170 g kg⁻¹ de argila) (EMBRAPA, 2013) e *deep Ferralsols* segundo a classificação da FAO (FAO, 1998; PRADIER et al., 2017). Os atributos físico-químicos do solo foram determinados até 1 m de profundidade (MAQUERE, 2008) (**Error! Reference source not found.** e Tabela 2). Antes da instalação do experimento a área era ocupada por um povoamento de *Eucalyptus grandis* com 6 anos de idade.

Tabela 1. Atributos físicos do solo até 1 m de profundidade (MAQUERE, 2008).

Profundidade	Areia	Silte	Argila
cm	-----g kg ⁻¹ -----		
0-5	760	70	170
5-15	790	40	180
15-50	775	35	190
50-100	730	40	230

Tabela 2. Atributos químicos do solo até 1 m de profundidade (MAQUERE, 2008).

Profundidade	N	C _{org}	P	pH	K	Ca	Mg	Na	H+Al	SB	CTC	V
cm	---g kg ⁻¹ ---	mg kg ⁻¹	água	-----mmolc kg ⁻¹ -----								%
0-5	17,6	31,5	4,0	4,6	0,125	0,218	0,312	0,00	23,54	1,40	24,94	5,0
5-15	6	7,8	1,9 ^a	5,3	0,047	0,008	0,130	0,00	11,66	0,30	11,95	2,0
15-50	4,5	6,1		5,5	0,029	0,005	0,032	0,00	8,80	0,09	8,89	1,0
50-100	3	4,7	1,3	5,7	0,016	0,000	0,012	0,00	6,49	0,04	6,53	1,0

H + Al = acidez potencial; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca de cátions; V% = saturação por bases; C_{org} = C orgânico; ^a valor médio entre a profundidade 5-50 cm.

5.2. Delineamento experimental

Em junho de 2010 foi instalado o experimento com o plantio de um clone de *E. grandis* da empresa Suzano Papel e Celulose S.A. O delineamento experimental foi de parcelas subdivididas (“*Split-splitP*”) com quatro tratamentos (2 regimes de precipitação x 2 regimes de fertilização) aplicados em 3 blocos. O fator principal foi o regime de precipitação (sem exclusão - 100% das chuvas (C3), com exclusão - 73% das chuvas (S3)) e o fator secundário o regime

de fertilização (aplicação de K, sem aplicação de K). Neste trabalho foram abordados 2 tratamentos, com exclusão (S3) e sem exclusão das chuvas (C3) ambos com a adição de $4,5 \text{ kmol ha}^{-1}$ de K.

A área de cada subparcela foi de 864 m^2 constituídas por 144 plantas dispostas em 12 linhas com 12 plantas por linha em um espaçamento $2 \times 3 \text{ m}$, sendo que as 3 linhas externas serviram como bordadura. Cada unidade experimental foi constituída por 36 árvores centrais (Figura 3).

A fertilização básica do momento do plantio foi de 33 kg ha^{-1} de P, 2000 kg ha^{-1} de calcário dolomítico e aplicação de micronutrientes. Aos 3 meses de idade aplicou-se 120 kg ha^{-1} de N e 176 kg ha^{-1} de K na forma de KCl.

Em setembro de 2010 a restrição das chuvas foi realizada através da instalação de uma cobertura transparente de polietileno que permite a transmissão da radiação fotossinteticamente ativa, formando calhas cobrindo 37% da superfície do solo. As calhas foram instaladas sobre estacas de madeira variando entre $1,5 \text{ m}$ a $0,30 \text{ m}$ de altura, gerando um declive para o escoamento da água (Figura 4).

Em junho de 2016 foi feito o corte das árvores e a segunda rotação, conduzida em talhadia.

Figura 3. Croqui do experimento de restrição hídrica. Apenas as subparcelas com cores foram utilizadas neste trabalho.

Figura 4. Fotos do experimento de restrição hídrica instalado na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga, (ESALQ/USP).

5.3. Amostragem

Neste trabalho a amostragem foi dividida em duas abordagens. Uma destinada a observar as características da estrutura (bactéria e fungos) e abundância (bactérias, fungos, arqueias e bactérias fixadoras do N) das comunidades microbianas por técnicas moleculares. Outra destinada a observar atributos microbiológicos do solo com solo fresco.

5.3.1. Amostragem para análise por técnicas moleculares

A amostragem destinada a observar as características da estrutura das comunidades microbianas foi realizada em 3 profundidades: 0-10 cm, 40-50 cm e 90-100 cm. Para a coleta utilizou-se um trado holandês, para evitar a contaminação entre as camadas realizou-se a limpeza do trado com etanol 70% do trado entre cada perfuração. As amostras foram coletadas entre julho de 2016 e julho de 2017 dias 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 sendo denominadas A1, A2, A3, A4 e A5 respectivamente (Figura 5). As amostras foram coletadas após o corte das árvores (jun/2016) contemplando o período inicial de crescimento das árvores e as épocas de menor precipitação (-p), entre junho e setembro e de maior precipitação (+P), de outubro a maio. As amostras contemplam tanto o período de menor precipitação entre junho e setembro quanto o período de maior precipitação de outubro a maio (CHRISTINA et al., 2015). Os dados de precipitação disponíveis no local permitiram confirmar situações contrastantes entre períodos de maior e menor incidência de chuvas (Figura 5; Tabela 3). A análise dos dados de umidade do solo até 1 metro de profundidade (medido com sondas de umidade TDR; Figura 6) mostrou fortes diferenças de umidade dependendo dos períodos (+P ou -p) e dos tratamentos (Controle C3 ou redução de chuva S3). As amostras foram coletadas com um trado holandês até cada profundidade avaliada e peneiradas (2mm) antes serem armazenadas em um freezer a -20°C até a sua utilização.

Figura 5. Datas de amostragem (A1 até A5) e dados da precipitação diária (mm) durante o ano em que foram feitas as coletas. Período de menor precipitação (-p); período de maior precipitação (+P).

Tabela 3. Precipitação acumulada nas datas amostradas.

Período	Amostra	Precipitação acumulada (mm)	
		10 dias a.c.	20 dias a.c.
-p	A1	0	14
	A2	83	128
+P	A3	66	113
	A4	91	167
-p	A5	0	0

a.c. = antes da coleta; -p = período de menor precipitação;
+P = período de maior precipitação

Figura 6. Umidade solo (sondas TDR) até 1 metro de profundidade dentro cada tratamento (acima C3, abaixo S3), extraído da tese de Germon (2019). Período de menor precipitação (-p); período de maior precipitação (+P).

5.3.2. Amostragem para análises de solo fresco

As amostragem destinada a observar os indicadores de atividade microbiana do solo foi realizada em 3 profundidades, com 3 repetições para cada profundidade por bloco (n=9): 0-10 cm, 10-20 cm e 40-50 cm. As amostras foram coletadas no dia 23/02/19, durante o período de maior precipitação (+P), com um trado holandês até cada profundidade, peneiradas (2mm) e armazenadas em câmara fria a 4°C até o momento das análises, de modo a minimizar alterações da atividade microbiana.

5.4. Técnicas moleculares

5.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 750 mg de solo utilizando o kit comercial de extração *FastDNA™ spin kit for soil* (MP Biomedicals, EUA) seguindo o protocolo do fabricante com uma modificação na etapa de purificação, utilizando tiocianato de guanidina (ANEXO A) (TOURNIER et al., 2015). Geralmente as extrações de DNA do solo são feitas a partir de 0,5 g de solo. No entanto como trabalhou-se com amostras até 1 m de profundidade e sabe-se que a biomassa microbiana diminui com o aumento desta, a massa de solo foi aumentada para obtenção de DNA suficiente para as análises até 1 metro de profundidade.

A verificação da integridade do DNA extraído foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) juntamente com o peso molecular *GeneRuler* 1 kb DNA *Ladder* (Thermo Fischer Scientific, EUA), o DNA foi corado com *GelRed®* (Biotium, EUA) e visualizado sobre luz ultra-violeta.

5.4.2. Quantificação do DNA

Na ausência de um protocolo de rotina para quantificação de DNA no laboratório, trabalhou-se no estabelecimento de um novo protocolo de quantificação de DNA, permitindo quantificar com precisão tanto o DNA dos plasmídeos utilizados na qPCR quanto das amostras desse trabalho. Como utilizou-se amostras de solo em um gradiente vertical com grandes diferenças de biomassa entre as camadas 0-10 cm e 90-100 cm, é importante a normalização das amostras antes da análise de qPCR. Testou-se 3 metodologias: a quantificação em gel; quantificação por Nanodrop™ (equipamento pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP); a quantificação através do Picogreen™, implementada no laboratório.

Foram realizados três ensaios: o primeiro com DNA fago comercial de concentração conhecida, o segundo com DNA extraído do solo da mesma área experimental e o terceiro de quantificação de DNA plasmídial seguido de uma reação de qPCR, sendo este somente para o método do Nanodrop™ e do Picogreen™.

Para o teste com DNA plasmídial preparou-se duas soluções utilizando o DNA e água molecular de modo a obter as seguintes concentrações de 5 e 10 ng μL^{-1} proseguindo com as quantificações. Para o teste com DNA do solo utilizou-se amostras de DNA extraídas do mesmo local do experimento seguindo o mesmo protocolo de extração para as profundidades 10-20 cm (IT2) e 40-50 cm (IT4). Também preparou-se diluições em água (1:2) dessas amostras sendo denominadas IT2d1/2 e IT4d1/2 de modo a comparar as metodologias de quantificação em diferentes camadas

do solo e também a consistência com as respectivas diluições. Por último realizou-se a quantificação de DNAs plasmidiais (pDNA) extraídos no laboratório contendo os seguintes genes (16S, 18S, nifH e AOA) através do Nanodrop™ e do Picogreen™. Com as concentrações obtidas pelas diferentes metodologias na quantificação do pDNA de AOA prosseguiu-se com a construção de duas curvas padrão e reação de qPCR de modo a comparar os diferentes valores de Ct obtidos para cada método.

5.4.2.1. Gel de agarose

For realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA), DNA corado com *GelRed*® (Biotium, EUA), visualizado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado em um transiluminador. Realizou-se a migração do padrão λ DNA (100 ng μL^{-1}), fornecido no kit *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific, EUA), utilizando as seguintes quantidades finais: 100, 75, 50, 25 e 0 ng de DNA, para construção da curva padrão; de um DNA controle com as concentrações 10 e 5 ng μL^{-1} , para avaliar a exatidão da curva; e de 7 μL de DNA das amostras do solo. A imagem obtida foi processada através do software de uso livre ImageJ para obtenção das áreas dos picos de intensidade de cada banda do gel (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Através dos dados das áreas do padrão foi construída a curva à qual os dados do controle e das amostras à serem quantificadas foram correlacionadas.

5.4.2.2. Nanodrop

A leitura das amostras foi realizada por espectrofotometria UV no equipamento *NanoDrop*™ 2000 (Thermo Fischer Scientific, EUA), utilizando 1 μL do DNA em cada leitura. A calibração do branco foi realizada pela aplicação de 1 μL da solução DES – kit *FastDNA*™ (água livre de DNase e pirogênicos), utilizada na última etapa do protocolo de extração de DNA (DESJARDINS; CONKLIN, 2010). Um controle com 5 e 10 ng μL^{-1} de DNA foi utilizado.

5.4.2.3. Picogreen

Realizada por espectrofluorimetria do DNA após a adição do reagente Picogreen presente no kit comercial *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific, EUA), conforme o protocolo descrito no ANEXO B. A leitura da fluorescência das amostras foi feita no equipamento *StepOne*™ Real Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, EUA). Além das amostras foi realizada a leitura do padrão λ DNA, fornecido no kit para obter as seguintes quantidades finais: 100, 50, 10, 1, 0,5, 0 ng de DNA para construção da curva padrão. Pela correlação da absorbância das amostras com as da curva obteve-se a concentração do DNA. A quantificação foi realizada em duplicata, a fim de validar a pipetagem. Um controle de 5 e 10 ng de DNA foi utilizado para cada placa de quantificação.

5.4.3. Estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP

A estrutura da comunidade bacteriana foi acessada pela análise da região do gene 16S rRNA pela técnica do T-RFLP (*Terminal Fragment Length Polymorphism*). A amplificação do gene alvo foi realizada por PCR (Reação em cadeia da polimerase) através dos *primers* 8fm marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) e 926r (SCHÜTTE et al., 2009) (ANEXO C).

A amplificação foi feita em solução 3 mM MgCl₂, 1 U Taq polimerase, 1X tampão livre de Mg²⁺ (Sinapse Inc, Brasil), 0,2 mM dNTP (Thermo Fischer Scientific, EUA), 0,2 µM de cada *primer*, 1 µL do DNA extraído em um volume final de 50 µL ajustado com água Mili-Q® autoclavada. As condições de reação no termociclador foram: 95°C por 4 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s e 72°C por 45s; extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de 3 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TAE 1X como descrito anteriormente.

Os produtos de PCR foram purificados com adição de 200 µL de isopropanol, seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente e centrifugação a 2129 g por 1 hora e 30 min, descarte do sobrenadante e a placa seca naturalmente por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 250 µl de etanol absoluto, centrifugação a a 2129 g por 1 hora e 30 minutos, descarte do sobrenadante e a placa seca naturalmente por 15 minutos. O produto purificado foi diluído em 25 µl de água Mili-Q® autoclavada e visualizada em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TAE 1X.

Após a purificação as amostras foram submetidas a uma reação de restrição utilizando a endonuclease HhaI (Thermo Fischer Scientific, EUA) (GCG▼C) conforme as especificações do fabricante. Após a reação de restrição, as amostras foram precipitadas com a adição de 4 µL do tampão acetato de sódio/EDTA e 50 µL de etanol absoluto e incubado por 15 min. Prosseguiu-se com centrifugação a 2129 g por 30 minutos, descarte do sobrenadante, adição de 70 µL de etanol 70% (v/v) e uma nova centrifugação a 2129 g por 20 min.

As amostras foram diluídas com formamida Hi-Di™ (Thermo Fischer Scientific, EUA) e marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies); analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Thermo Fischer Scientific, EUA). Os resultados foram processados usando o programa GeneMapper® 4.1 (Thermo Fischer Scientific, EUA), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência.

5.4.4. Estrutura da comunidade fúngica por DGGE

A estrutura da comunidade fúngica foi acessada pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) utilizando os *amplicons* formados por uma *nested*-PCR (ANDERSON; CAMPBELL; PROSSER, 2003).

Para a primeira reação de PCR foram utilizados os *primers* EF4 (SMIT et al., 1999) e ITS4 (WHITE et al., 1990) (ANEXO C) que amplificam a região do gene 18S rRNA e do ITS. A amplificação foi feita em solução 3,75 mM MgCl₂, 2 U Taq polimerase, 1X tampão livre de Mg²⁺ (Sinapse Inc, Brasil), 0,2 mM dNTP (Thermo Fischer Scientific, EUA), 0,4 µM de cada *primer*, 1 µL do DNA extraído em um volume final de 25 µL ajustado com água Mili-Q® autoclavada. As condições de reação no termociclador foram: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 90 s; extensão final de 72°C por 5 min.

A segunda reação de PCR foi realizada com os *primers* ITS1-F (GARDES; BRUNS, 1993) com um grampo GC na extremidade 5' e ITS2 (WHITE et al., 1990) (ANEXO C) que amplificam a região ITS. A amplificação foi feita em solução 2,5 mM MgCl₂, 1,5 U Taq polimerase, 1X tampão livre de Mg²⁺ (Sinapse Inc, Brasil), 0,2 mM dNTP (Thermo Fischer Scientific, EUA), 0,4 µM de cada *primer*, 1 µL do produto da primeira PCR em um volume final de

25 µL ajustado com água Mili-Q® autoclavada. As condições de reação no termociclador foram: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 90 s; extensão final de 72°C por 5 min. Uma alíquota de 3 µL do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TAE 1X.

A análise de DGGE foi realizada no aparelho Ingeny PhorU2 System (Ingeny, Holanda) seguindo a metodologia descrita por Anderson et al (2003). Oito microlitros dos produtos formados na segunda reação foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão TAE 0,5M (20 mM Tris–acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). O gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 20 a 55%, em que 100% corresponde a concentração de 7M de uréia e 40 % (m/v) de formamida). Os géis foram submetidos a tensão de 90 V e temperatura de 60°C por 16 horas. Os géis foram corados com SYBR-green® (Thermo Fischer Scientific, EUA), por uma hora na ausência de luz e escaneados sob luz UV.

Os perfis de bandas nas imagens digitais dos géis de DGGE foram analisados pelo programa BioNumerics 5.10 (Applied Maths NV, Bélgica), o qual gerou uma matriz de dados com valores de ausência e presença de bandas que foi utilizada nas análises posteriores.

5.4.5. Abundância das comunidades por PCR em tempo real (qPCR)

Para a quantificação das comunidades microbianas totais (arqueias, fungos e bactérias) e das comunidades envolvidas no ciclo do N foi utilizada a técnica de qPCR utilizando o marcador fluorescente SYBR® Green I. As quantificações dos genes alvo foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, EUA). As reações, com exceção da quantificação dos fungos, foram preparadas com os seguintes componentes: 1X SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, EUA), 0,15 µg.µL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA), 1 µM dos primers a serem utilizados (ANEXO C), 2 µL do DNA molde com concentração de 1.25 ng µL⁻¹ e volume final ajustado para 10 µL com água livre de nucleases (QIAGEN, Alemanha). Para os fungos a solução foi preparada com os seguintes componentes: 1X SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, EUA), 0,15 µg.µL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA), 0,5 µM dos primers a serem utilizados (ANEXO C), 2 µL do DNA molde com concentração de 1.25 ng µL⁻¹ com volume final ajustado para 10 µL com água livre de nucleases (QIAGEN, Alemanha).

A construção da curva padrão foi feita a partir do DNA de plasmídeos extraídos de clones contendo as sequências de cada gene avaliado. Os clones são pertencentes ao Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ-USP, e foram cedidos pela unidade de pesquisa conjunta Eco&Sols, Montpellier, França. A extração dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração dos plasmídeos determinada foi determinada pelo método do Picogreen. Para a construção da curva foi feito o cálculo do volume do DNA extraído necessário para atingir a concentração de 0,5 E8 cópias µL⁻¹.

Para a realização do cálculo primeiro determinou-se o peso molecular do plasmídeo (ng mol⁻¹): ((comprimento do plasmídeo * 607,4 + 157,9) * 1E9), em que o comprimento do plasmídeo é o tamanho do vetor utilizado na clonagem somado ao fragmento inserido em pares de base, a multiplicação por 607,4 refere a massa molecular média de cada base dupla fita, 157,9 é a massa dos monofosfatos presentes na extremidade 5', a multiplicação por E9 é a conversão de grama para nanograma; Posteriormente calculou-se a molaridade do plasmídeo (mol µL): (Concentração (ng µL⁻¹) / peso molecular (mol µL⁻¹)); calculou-se o número de cópias por microlitro (Ci): (Ci = molaridade do plasmídeo * 6,023 E23), em que 6,023 E23 é a constante de Avogadro; por fim calculou-se o volume

inicial (V_i) do plasmídeo necessário para obter a concentração final (C_f) de 0,5 E8 (C_f) em 100 μ L de solução (V_f): ($V_i = (C_f * V_f)/C_i$). Esses cálculos podem ser resumidos na seguinte equação: (comprimento do plasmídeo com a sequência do gene * 607,4 + 157,9) * 8,3 E-6 / Concentração do plasmídeo.

A abundância da comunidade total de bactérias foi estimada através do gene 16S rRNA utilizando os primers 341F e 534R (LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2004) (ANEXO C). As condições de reação no termociclador foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s e coleta dos dados; curva de *melting* dos 55°C aos 95°C. A eficiência média das curvas foi de 95,68 % e o desvio padrão (SD) 1,34%.

A abundância da comunidade total de fungos foi estimada através do gene 18S rRNA utilizando os primers FR1 e FF390 (PRÉVOST-BOURÉ et al., 2011) (ANEXO C). As condições de reação no termociclador foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 30 s, 72°C por 30 s e coleta dos dados; curva de *melting* dos 55°C aos 95°C. A eficiência média das curvas foi de 90,64 % (SD=0,23%).

A abundância da comunidade total de arqueias foi estimada através do gene 16S rRNA utilizando os primers 771F e FF390 (OCHSENREITER et al., 2003) (ANEXO C). As condições de reação no termociclador foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s e coleta dos dados; curva de *melting* dos 55°C aos 95°C. A eficiência médias das curvas foi de 90,51 % (SD=1,34%).

A abundância da comunidade total de bactérias fixadoras do N foi estimada através do gene *nifH*, utilizando os primers *polF* e *polR* (GABY; BUCKLEY, 2012) (ANEXO C). As condições de reação no termociclador foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s e coleta dos dados; curva de *melting* dos 55°C aos 95°C. A eficiência média das curvas foi de 90,30 % (SD=0,40%).

A estimativa do número de cópias de cada gene foi calculada interpolando o valor de ciclos obtidos por amostra ($CT = \text{threshold cycles}$) na regressão linear gerada pela curva padrão. A eficiência (E) do *qPCR* foi calculada com a equação: $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$, sendo *slope* o valor da inclinação da reta de regressão.

5.5. Indicadores Biológicos de atividades microbiana com solo fresco

5.5.1. Carbono da biomassa microbiana e respiração basal

A determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) foi realizada através do método do clorofórmio fumigação extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). Dez gramas de solo foram fumigadas em um dessecador contendo 25 mL de clorofórmio livre de etanol enquanto outras 10 gramas de solo foram mantidas em condições ambiente, ambas por 24 h. Após esse período realizou-se a extração pela adição de 40 mL de K_2SO_4 0,5 M e agitação (200 rpm; 30 min). As amostras foram então filtradas em papel filtro Whatman nº 2. Transferiu-se 8 mL do filtrado para um tubo digestor, ao qual foi adicionado 2 mL de $K_2Cr_2O_7$ 66,7 mM e 15 mL da mistura 1:2 (v/v) de H_2SO_4/H_2PO_4 incubando em banho-maria a 100 °C por 30 min. A solução foi transferida para um Erlenmeyer ao qual adicionou-se água deionizada q.s.p. 50 mL. A titulação do $K_2Cr_2O_7$ excedente foi realizada com uma solução de $(NH_4)_2Fe(SO)_4 \cdot 6H_2O$ 33,3 mM em H_2SO_4 concentrado, utilizando o indicador ferroína (1,485 g de *o*-fenantrolina e 0,695 g de $FeSO_4$ em 100 mL de água deionizada). O carbono da biomassa foi determinado pela quantidade de Cr (+VI) que foi reduzido a Cr (+III) durante a oxidação da matéria orgânica (dricromato gasto na reação). O CBM foi determinado pela diferença do C orgânico das amostras fumigadas e não fumigadas, utilizando o coeficiente de conversão $kc = 0,4$ (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

Para estimar a respiração basal (C-CO₂) do solo adicionou-se 100 g de solo fresco em frascos de incubação contendo 20 mL de NaOH 1M disposto em um pequeno frasco, de modo que este capture o CO₂ produzido sem entrar em contato com o solo. Os frascos foram hermeticamente fechados e incubados durante 15 dias. Os frascos com NaOH foram titulados para determinação do NaOH remanescente e substituídos por novos frascos após 24 h, 3d, 7d, 15d. Para a titulação adicionou-se 1 mL de uma solução de BaCl₂ em água deionizada 50% (m/m) e duas gotas do indicador fenolftaleína, procedendo então com a titulação do NaOH excedente com uma solução 0,5M de HCl. O carbono liberado foi calculado pelas taxas de emissão de cada período (mg C g⁻¹ solo d⁻¹) (ISERMEYER, 1952).

5.5.2. Atividades enzimáticas

5.5.2.1. Fosfatase ácida e alcalina

A avaliação da atividade da fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) e alcalina (EC 3.1.3.1) foi feita pelo método colorimétrico proposto por Tabatabai, (1994) adaptado. Um grama de solo foi adicionado em tubos de ensaio, seguido da adição de 4 mL do tampão universal MUB pH 6,5, e 1mL de solução do substrato p-nitrofenil fosfato (PNF) 0,05 M, com exceção dos controles, procedendo com agitação em *vortex* e incubação em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após a incubação foi adicionado 1 mL de CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5. Aos tubos controle foi adicionado 1 mL da solução PNF. Os tubos foram agitados em *vortex* e a solução filtrada em papel filtro Whatman n° 2. A absorbância do filtrado foi determinada em espectrofotômetro regulado ao comprimento de onda de 410 nm. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada pela correlação com uma curva padrão construída com p-nitrofenol.

A avaliação da fosfatase alcalina seguiu o mesmo protocolo que a da fosfatase ácida, com exceção do tampão MUB que foi utilizado com pH 11.

5.5.2.2. β-Glucosidase

A avaliação da atividade da β-glucosidase (EC 3.2.1.21) foi feita pelo método colorimétrico proposto por Tabatabai, (1994) adaptado. Em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 1 g de solo, 2 mL do tampão MUB pH 6 e 1 mL de solução p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (PNG) 25 mM, com exceção dos controles. Os tubos foram agitados em *vortex* e incubados em banho-maria por 1 h a 37°C. Após o período de incubação foi adicionado 1 mL de solução CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de solução THAM (Tris- Hidroximetil-Amino-Metano) 0,1 M pH 12. Aos tubos controle foi adicionado 1 mL da solução PNG. Os tubos foram agitados em *vortex* e a solução filtrada em papel filtro Whatman n° 2. A absorbância do filtrado foi determinada em espectrofotômetro regulado ao comprimento de onda de 420 nm. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada pela correlação com uma curva padrão construída com p-nitrofenol.

5.6. Análise estatística

Os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e para homocedasticidade pelo teste de Breusch-Pagan. Atendido aos critérios os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando obtido F significativo, foi realizado o teste de Tukey (p < 0,05) para comparação das

médias. Para essas análises foram utilizados os pacotes “*lmtest*” e “*agricolae*” no programa R versão 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019).

Para análise dos dados do T-RFLP, calculou-se a abundância relativa das áreas de picos dos fragmentos de restrição terminal (T-RFs). A abundância relativa foi tomada como sendo a porcentagem de cada T-RF na soma de todas as áreas de picos do perfil de T-RFLP. Para os dados do DGGE utilizou-se a matriz obtida pelo programa programa BioNumerics 5.10 (Applied Maths NV, Bélgica). As diferenças entre os perfis de T-RFLP e do DGGE foram comprovadas por meio da análise de dissimilaridade (ANOSIM) e visualização gráfica por meio de análise de coordenadas principais (PCoA) com uso do programa PAST 3.22 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

A análise de redundância baseada em distâncias calculadas pelo método de Bray-Curtis (dbRDA) foi realizada com os perfis das amostras de superfície obtidos pelo T-RFLP e DGGE, utilizados como variáveis resposta, e como variáveis explicativas foram utilizados os de umidade do solo e os dados químicos referentes a concentração de NH_4^+ , NO_3^- e N_2O obtidos por Germon (2019). As diferenças foram comprovadas através do teste de permutação sugerido por Legendre, Oksanen e Ter Braak (2011) contido no pacote “vegan” através do no programa R versão 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Comparação de metodologias de quantificação do DNA

Realizou-se uma comparação de diferentes metodologias de quantificação do DNA de modo a estabelecer um novo protocolo que, permitisse quantificar com precisão as amostras desse trabalho e os plasmídeos utilizados na qPCR. Foram feitas a quantificação de DNA fago, DNA extraído do solo e DNA plasmidial (pDNA), utilizando as metodologias de quantificação por gel de agarose, pelo Nanodrop™ e pelo PicoGreen™.

Para o ensaio de quantificação dos controles feitos com um DNA de fago com concentração conhecida, as três metodologias apresentaram resultados satisfatórios, variando de 3,4 a 6,8 ng μL^{-1} para a concentração de 5,0 ng μL^{-1} e de 9,4 a 11,3 ng μL^{-1} para a concentração de 10 ng μL^{-1} (Tabela 4). As menores variações com os valores de quantificação do controle foram observadas na quantificação com o Nanodrop™ (0,2 e 0,6 ng/ μL de diferença em relação aos controle de 5 e 10 ng μL^{-1} respectivamente).

Tabela 4. Resultados dos testes de quantificação do DNA pelas diferentes metodologia (ng μL^{-1}).

	Gel	Nanodrop™	PicoGreen™
Controle 5 ng μL^{-1}	3,4	5,2	6,8
Diferença para o controle	-1,6	0,2	1,8
Controle 10 ng μL^{-1}	10,3	9,4	11,3
Diferença para o controle	0,3	-0,6	1,3
IT2 (10-20 cm)	6,1	59,6	33,4
IT2 d1/2	7,9	24,8	16
IT2 teórico	15,8	49,6	32
Diferença entre IT2 e IT2 teórico	9,7	-10	-1,4
IT4 (30-40 cm)	2,7	36,9	5,3
IT4 d1/2	1	12,3	2,5
IT4 teórico	2	24,6	5
Diferença entre IT4 e IT4 teórico	-0,7	-12,3	-0,3
IT teórico = ITd1/2 * 2; diferença = IT medido - IT teórico			

Quanto a quantificação do DNA extraído do solo foram testadas quatro amostras: IT2, que representa a camada 10-20 cm, IT2d1/2 que é a diluição em água (1:2) de IT2, IT4 que representa a camada 30-40 cm e IT4d1/2 que é a diluição em água (1:2) de IT4. Foram observadas grandes diferenças entre as três metodologias (Tabela 4). Podemos apresentar como exemplo a amostra IT2, em que a quantificação pelo gel de agarose foi de 6,1 ng μL^{-1} , pelo PicoGreen™ foi 33,4 ng μL^{-1} e pelo Nanodrop™ foi 59,6 ng μL^{-1} .

Para ambas as amostras, a quantificação pelo método do gel foi a que apresentou os menores valores, enquanto que pelo Nanodrop™ a que apresentou os maiores. Esse resultado é consistente com os dados da literatura que indicam que o método Nanodrop™ pode quantificar as impurezas presentes nos extratos e, portanto, superestimar os ensaios de DNA (DESJARDINS; CONKLIN, 2010). O risco é ainda maior para amostras ambientais, pois apesar

das etapas de purificação do DNA, as amostras ainda podem conter resquícios de ácidos húmicos ou de sais utilizados durante o processo de purificação (*e.g.* isotiocianato de guanidina) (DESJARDINS; CONKLIN, 2010; THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC., 2010). Por esse motivo o método do Picogreen™ é geralmente preferido em ensaios de DNA de amostras ambientais geralmente descritos (CASTRILLO et al., 2017; HU et al., 2018; SANDAA; ENGER; TORSVIK, 1998).

Apesar das diferenças entre os métodos, a concentração de DNA para as amostras de IT2 (0-10 cm) foi sempre maior do que para as amostras de IT4 (30-40 cm). Estes resultados são consistentes com a diminuição da biomassa microbiana com um gradiente vertical (FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a; PEREIRA et al., 2017).

Para validar os diferentes métodos, comparou-se os resultados de quantificação das duas amostras puras com os das suas respectivas diluições (1:2) (Tabela 4). A quantificação pelo gel de agarose apresentou resultados incoerentes para a amostra IT2 (6,1 ng μL^{-1}) e sua diluição IT2d1/2 (7,9 ng μL^{-1}) que obteve maior concentração. O resultado é mais consistente com a amostra IT4, mas com concentrações muito baixas que podem ter afetado a precisão da quantificação. A quantificação pelo Nanodrop™ obteve resultados mais coerentes, com a maior concentração na amostra mais superficial IT2 (59,6 ng μL^{-1}) diminuindo em sua diluição IT2d1/2 (24,8 ng μL^{-1}). No entanto ao calcular-se a concentração de IT2 a partir do resultado obtido na sua diluição IT2d1/2 obtém-se o valor de 49,6 ng μL , uma diferença de 10 ng μL em relação ao valor medido em IT2 sem diluição.

Os melhores resultados entre amostras não diluídas e diluídas foram obtidos pelo método Picogreen™. A quantificação pelo Picogreen™ apresentou resultados coerentes, com a maior concentração na amostra mais superficial IT2 (33,4 ng μL^{-1}) diminuindo em sua diluição IT2d1/2 (16 ng μL^{-1}).

O valor teórico de IT2, calculado a partir da concentração de sua diluição IT2d1/2 é muito próximo do valor mensurado para a amostra de IT2 (32 ng μL^{-1} contra 33,4 ng μL^{-1} , com apenas 1,4 ng μL^{-1} de diferença). O mesmo padrão de resultado foi observado para a amostra IT4, com apenas 0,3 ng μL^{-1} de diferença entre o valor calculado e o medido. A quantificação da amostra IT4d1/2 foi de 2,5 ng μL^{-1} , um valor baixo e esperado, já que se trata da diluição da camada 30-40 cm.

Também foi feito um teste de quantificação dos DNAs plasmidiais (pDNA) utilizados na construção das curvas padrão da qPCR através dos métodos do Nanodrop™ e do Picogreen™ (Tabela 5). Os resultados confirmaram valores de concentração muito mais altos com o método do Nanodrop™. Esse resultado não era esperado, pois em geral o Nanodrop™ apresenta bons resultados em extratos de DNA não ambientais (YU et al., 2017). Mas é possível que tenham ocorrido contaminações durante o processo de extração do pDNA, em que restaram resíduos do meio de cultura utilizado no cultivo microbiano hospedando os plasmídeo, ou de sais, como o tiocianato de guanidina, utilizados nas etapas de purificação do DNA (DESJARDINS; CONKLIN, 2010).

Tabela 5. Comparação da quantificação do DNAp pelo Nanodrop™ e pelo PicoGreen™ (ng μL^{-1}).

	Nanodrop	PicoGreen
16S	125	25
18S	51	21
nifH	77	26
AOA	54	12

Foi realizado um primeiro teste de uma curva padrão de *q*PCR construída com base nos valores de concentração quantificados pelo Nanodrop™ (Tabela 5). O valor de Ct da maior concentração (1E8) foi muito alto (21 ciclos; Tabela 6), sendo que as diluições subsequentes rapidamente se aproximaram ao valor do controle negativo, impossibilitando a quantificação. Foi realizado um segundo teste de maneira similar, mas com os valores de concentração do pDNA quantificados através do Picogreen™ (Tabela 5). Os resultados obtidos neste segundo teste foram muito melhores (Tabela 6), com um valor de Ct da maior concentração de 6,8 que condiz com os valores de referência da França (Eco&Sols, Montpellier), em que o plasmídeo é utilizado de maneira rotineira. Tais resultados confirmam a superestimação da quantificação através do Nanodrop™, impossibilitando o seu uso neste trabalho.

Para a quantificação das amostras adotou-se a metodologia do Picogreen™, devido aos resultados positivos mencionados acima em conjunto com a praticidade de se quantificar um grande número de amostras simultaneamente, uma vez que a quantificação pode ser realizada em microplacas de 48 ou 96 poços, de acordo com o equipamento disponível.

Tabela 6. Comparação dos valores de Ct obtidos para cada concentração (cópias μL^{-1}) de DNAP do gene AOA utilizado na construção da curva padrão após a quantificação pelo Nanodrop™, Picogreen e com os valores de referência da França.

	1E+08	1E+07	1E+06	1E+05	1E+04	1E+03	1E+02	NTC
NanoDrop	21.0	24.8	28.7	30.7	32.4	32.4	31.4	33.5
PicoGreen	6.8	10.8	15.5	19.0	22.5	26.3	30.2	34.0
Referência França	5.0	8.8	12.1	15.7	19.3	22.7	26.5	32.5

6.2. Estrutura das comunidades bacteriana e fúngica

6.2.1. Estrutura da comunidade bacteriana

Estudou-se a estruturação de comunidades microbianas pelo método T-RFLP para bactérias e fungos. No entanto, para os fungos, encontrou-se problemas na reação de amplificação, que forçaram a adoção de uma nova metodologia, no caso, a técnica DGGE. Devido à restrição da utilização de muitas amostras com a DGGE e dos limites de comparação entre géis (NUNAN et al., 2005), para os fungos, optou-se por trabalhar apenas com 2 épocas (A3 e A5) e pela profundidade de 0 a 10 cm para todas as épocas.

A análise das coordenadas principais (PCoA) dos dados obtidos pela técnica de T-RFLP da comunidade bacteriana foi feita para os tratamentos C3 e S3 separadamente, de modo a avaliar o efeito da profundidade e da época do ano para cada situação.

Primeiro, testou-se o impacto da época da amostragem na estrutura das comunidades bacterianas. O período de amostragem obteve um efeito significativo para cada um dos dois tratamentos (com e sem redução de chuva) (Tabela 7; Figura 7). Este resultado condiz com os já descritos pela literatura, que mostram um forte impacto das estações nas comunidades microbianas, devido as variações de fatores abióticos como temperatura e umidade e de fatores bióticos como a rizodeposição que é uma fonte de carbono orgânico disponível aos micro-organismos (HABEKOST et al., 2008; LAUBER et al., 2013; REGAN et al., 2017).

Tabela 7. Análise de similaridade de ANOSIM pelo índice de Bray-Curtis. Agrupamentos da comunidade de bactérias (16S rRNA). Agrupamentos da comunidade fúngica (18S rRNA).

	Bactérias		Fungos	
	Época	Profundidade	Época	Profundidade
C3	***	***	**	***
S3	***	***	**	**
	Tratamento	Profundidade	Tratamento	--
A1	n.s.	**	n.s.	
A2	**	***	n.s.	
A3	n.s.	**	n.s.	
A4	n.s.	**	n.s.	
A5	**	***	n.s.	

*** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; n.s. = não significativo ($p > 0.05$), para o teste de análise de similaridade (ANOSIM, 9999 permutações).

Figura 7. - Análise das coordenadas principais (PCoA), baseado no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis do perfil das comunidades bacterianas obtidas por T-RFLP ao longo do tempo, na área sem restrição (C3: 100% precipitação). D1: 0-10 cm; D2: 40-50 cm; D3: 90-100 cm. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem as datas 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 respectivamente.

Em uma segunda etapa, testou-se o efeito da profundidade e observou-se que a essa é um fator estruturante para as comunidades bacterianas (Tabela 7; Figura 8) para ambos os tratamentos, sendo possível observar uma mudança gradual dos agrupamentos com o aumento da profundidade (Figura 8). Tal resultado corrobora os já encontrados na literatura, que mostram um forte impacto das profundidade na estrutura das comunidades microbianas, relacionado principalmente pelas mudanças na disponibilidade de C aos micro-organismos com o aumento da profundidade (EILERS et al., 2012; KO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

Figura 8. Análise das coordenadas principais (PCoA), baseado no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis do perfil das comunidades bacterianas obtidas por T-RFLP entre as diferentes profundidades, na área sem restrição (C3, 100% precipitação). A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem as datas 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 respectivamente.

Os dados também foram analisados para cada época separadamente, para observar o efeito do tratamento e da profundidade (Figura 9). Nesta análise constatou-se agrupamentos em função da profundidade ($p \leq 0,01$) para todas as épocas, enquanto que o tratamento apresentou agrupamentos ($p \leq 0,01$) apenas para as épocas A2 (período de maior incidência de chuvas) e A5 (período de menor incidência de chuvas) (Tabela 7). Aparentemente o fato de ter amostrado durante o período de maior ou menor incidência de chuvas não demonstrou ter impacto na diferenciação entre os tratamentos, o que pode ser observado em cada uma das datas.

Figura 9. Análise das coordenadas principais (PCoA), baseado no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis do perfil das comunidades bacterianas obtidas por T-RFLP ao longo do tempo. C3: 100% precipitação; S3: 73% precipitação. D1: 0-10 cm; D2: 40-50 cm; D3: 90-100 cm. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem as datas 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 respectivamente.

Na literatura, podemos encontrar diversos exemplos do impacto da redução de chuvas nas comunidades microbianas (BOUSKILL et al., 2013; PREECE et al., 2019; TAKETANI et al., 2017). No entanto, Hicks et al. (2018) realizaram um trabalho em que foi implementada uma restrição hídrica de 50% em uma monocultura de carvalho (*Quercus robur* L.) e não observaram diferenças na estrutura da comunidade bacteriana. Em outro estudo, com uma restrição hídrica similar a deste trabalho, a estrutura da comunidade foi acessada por T-RFLP a partir do DNA (comunidade total), do RNA (comunidade ativa) e também por pirosequenciamento a partir do RNA (comunidade ativa); os autores relataram que nas análises por T-RFLP, não verificaram diferenças em relação a redução de chuvas; mas para a comunidade ativa, quando acessada por sequenciamento sim, porém de maneira fraca sendo que outras variáveis como o local de coleta ou e a vegetação demonstraram um efeito muito mais forte (FELSMANN et al., 2015).

No presente trabalho, o efeito da profundidade sobre a estrutura da comunidade foi mais forte que o da restrição hídrica, ainda assim, é possível observar uma tendência de agrupamento das amostras de cada tratamento (Figura 9), que inclusive, foi significativa para as épocas A2 e A5 (Tabela 7). É plausível que com metodologias mais robustas como sequenciamento, seja possível a observação de diferenças entre os tratamentos. No estudo de Robin et al. (2019), realizado no mesmo experimento, avaliou-se efeito da redução de chuvas na diversidade de fungos ectomicorrízicos associados ao gênero *Pisolithus* spp através do sequenciamento Illumina MiSeq, os resultados deste estudo apontaram uma clara diferenciação entre o tratamento de redução de chuvas e o controle, um indício de que a ausência do efeito da redução de chuvas pode estar associado a metodologia utilizada.

A maioria dos estudos sobre o efeito de um estresse hídrico sobre as comunidades microbianas foram realizados na camada de 0-20 cm do solo (FELSMANN et al., 2015; LI et al., 2018; TAKETANI et al., 2017), sendo que poucos estudos foram feitos em camadas mais profundas do solo. Os resultados obtidos mostram claramente um efeito de profundidade na estruturação de comunidades bacterianas, porém a diferença entre tratamentos neste

trabalho não se mostrou mais significativa na camada mais profunda em relação a superficial, sugerindo um efeito da restrição hídrica similar ao longo do perfil do solo. Porém a comparação da umidade no perfil do solo entre os dois tratamentos (com e sem redução pluviométrica) destacou um forte impacto da profundidade após 4 metros de profundidade, sugerindo que pode valer a pena perseguir investigações além de 1 metro de profundidade em estudos futuros.

6.2.2. Estrutura da comunidade fúngica

Para avaliar o efeito da época de amostragem na estrutura da comunidade fúngica utilizou-se os dados obtidos através da técnica de DGGE para os tratamentos C3 e S3 separadamente. O período de amostragem mostrou um efeito significativo (Tabela 7; Figura 10). Posteriormente avaliou-se o efeito da profundidade e do tratamento entre os períodos A3 e A5 (Tabela 7; Figura 11).

Figura 10. Análise das coordenadas principais (PCoA), baseado no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis do perfil das comunidades fúngicas obtidas por DGGE ao longo do tempo, na área sem restrição (C3, 100% precipitação (0-10 cm). A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem as datas 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 respectivamente.

De maneira análoga a comunidade bacteriana, observou-se resultados significativos apenas para a profundidade, condizente com os dados na literatura em que tais mudanças também são relacionadas a diferenças em relação a disponibilidade de C (FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a; SCHUTTER; SANDENO; DICK, 2001; ŽIFČÁKOVÁ et al., 2016).

Quando observado o efeito da restrição de chuvas para cada época, não verificou-se agrupamentos significativos para nenhuma das datas (Tabela 7). Vários estudos relatam o efeito da redução de chuvas na composição da comunidade fúngica (HAWKES et al., 2011; HE et al., 2017; KAISERMANN et al., 2015) o que não foi observado neste trabalho. Ren et al. (2018) também não observaram efeito da redução de chuvas e atribuíram esse resultado às características adaptativas presentes nos fungos, como a presença de hifas que permitem a obtenção de nutrientes disponíveis (MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012). Porém é importante cautela nessa afirmação, uma vez que a técnica do DGGE possui menor resolução em relação ao T-RFLP e sequenciamento, o efeito da restrição hídrica pode ter sido mascarado neste trabalho (KARCZEWSKI; RISS; MEYER, 2017; NUNAN et al., 2005).

Figura 11. Análise das coordenadas principais (PCoA), baseado no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis do perfil das comunidades fúngicas obtidas por DGGE. Agrupamentos em função da profundidade e do tratamento na profundidade para as épocas A2 (14/12/17) e A5 (17/07/18).

6.3. Abundância das comunidades microbianas

Para concluir as análises sobre a estrutura das comunidades microbianas, quantificou-se por *q*PCR a abundância das comunidades totais: bactérias, fungos e arqueias (genes 16S, 18S e 16S rRNA respectivamente); e da comunidade funcional das bactérias fixadoras do N (gene *nifH*), envolvida no ciclo do nitrogênio.

O número de cópias do gene 16S rRNA de bactérias por grama de solo seco variou de 1,75E9 a 4,37E9 e não apresentou diferença significativa ao efeito da restrição de chuvas para nenhuma das épocas avaliadas. As amostras submetidas ao estresse hídrico variaram de 2,35E9 a 4,37E9 cópias g⁻¹ solo seco e não apresentaram efeito significativo para a época. Para as amostras não submetidas a restrição de chuvas observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as datas A2 e A4, ambas do período de maior precipitação (+P), com 1,75E9 e 4,51E9 cópias g⁻¹ solo seco respectivamente (Figura 12A; Tabela 8).

Figura 12. Quantificação dos genes 16S rRNA de arqueas e bactérias, 18S de fungos e o gene *nifH* das bactérias fixadoras de N expressos em n^o cópias g solo seco⁻¹. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem as datas 27/07/16, 14/12/16, 14/03/17, 24/04/17 e 17/07/17 respectivamente. As diferenças foram determinadas através da ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as datas amostradas, o símbolo de asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos na data amostrada.

O aumento da abundância de bactérias entre estação seca e chuvosa já foi descrito na literatura (LAZZARO; HILFIKER; ZEYER, 2015; TAKETANI et al., 2017), mas neste estudo não foi observado este efeito. Também não foi observado um efeito do tratamento de exclusão de chuvas, que pode ser explicado pela adaptação das comunidades em função das variações sazonais que ocorrem no ambiente (CREGGER et al., 2012; FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003b).

A quantificação do gene 18S rRNA de fungos variou entre 2,28E7 e 8,05E7 cópias g⁻¹ solo seco. Observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a data A3, no período maior precipitação (+P), em que a amostra com restrição hídrica obteve 4,51E7 cópias g⁻¹ solo seco, enquanto a amostra sem restrição obteve 8,05E7 cópias g⁻¹ solo seco. As amostras submetidas ao estresse hídrico variaram de 2,90E7 a 7,02E7 cópias g⁻¹ solo seco e não apresentaram efeito significativo para a época. Para as amostras não submetidas a restrição de chuvas observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as datas A2 e A3, ambas do período de maior precipitação (+P), com 2,28E7 e 8,05E7 cópias g⁻¹ solo seco, respectivamente (Figura 12B; Tabela 8).

Estes resultados parecem indicar um impacto negativo da restrição de chuva. As comunidades de fungos são menos sensíveis à restrição de água do que as comunidades bacterianas (CREGGER et al., 2012; HAWKES et al., 2011; REN et al., 2018) o que pode ser explicado por sua maior adaptação à falta de água, por mecanismos como a produção de esporos e o desenvolvimento de um sistema micelial que permita buscar água em outras áreas (LEHTO; ZWIAZEK, 2011; MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012), mas há estudos que relatam uma tendência de maior abundância fúngica na ausência de restrição, de maneira similar ao aqui retratado (CREGGER et al., 2012). Tais diferenças podem estar relacionadas a forma como o experimento foi projetado, nas metodologias adotadas e às diferenças inerentes aos ecossistemas em questão (HE et al., 2017). As comunidades de fungos de diferentes locais respondem de maneiras distintas a alterações na precipitação devido a diferenças na composição da comunidade (KWON; HARAGUCHI; KANG, 2013), embora neste trabalho não tenha se verificado diferenças na estrutura pela técnica do DGGE essa pode ser uma explicação para a maior abundância de fungos na época A3.

Tabela 8. Abundância dos genes 16S rRNA de arqueas e bactérias, 18S de fungos e o gene *nifH* das bactérias fixadoras de N expressos em no cópias g solo seco -1.

Bactérias					Fungos				
	C3		S3			C3		S3	
A1	2,3E+9	ab	2.35E+09	n.s.		3.49E+07	ab	2.90E+07	n.s.
A2	1,7E+9	b	3.48E+09	n.s.		2.28E+07	b	2.95E+07	n.s.
A3	3,9E+09	ab	2.62E+09	n.s.		8.05E+07	a *	4.51E+07	n.s.
A4	4,5E+09	a	2.88E+09	n.s.		7.36E+07	ab	7.27E+07	n.s.
A5	2,1E+9	ab	4.37E+09	n.s.		3.14E+07	ab	6.08E+07	n.s.
Arquéias					<i>nifH</i>				
	C3		S3			C3		S3	
A1	1.97E+07	cd	1.73E+07	n.s.		8.92E+06	n.s.	8.26E+06	n.s.
A2	1.89E+07	d	3.44E+07	n.s.		4.97E+06	n.s.	1.16E+07	n.s.
A3	3.42E+07	bc	1.77E+07	n.s.		1.13E+07	n.s.	4.36E+06	n.s.
A4	6.67E+07	a *	3.21E+07	n.s.		1.24E+07	n.s.	4.78E+06	n.s.
A5	3.47E+07	b	4.82E+07	n.s.		4.42E+06	n.s.	1.12E+07	n.s.

Abundância das comunidades acessada por qPCR. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada data ($p < 0,05$); Letras diferentes indicam diferenças entre as datas de cada tratamento ($p < 0,05$. ANOVA e teste de Tukey).

O gene 16S rRNA de arqueias variou entre 1,73E7 e 6,67E7 cópias g⁻¹ solo seco (Figura 12C; Tabela 8)). Observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a data A4, durante o período de maior precipitação (+P), em que a amostra com restrição hídrica obteve 3,21E7 cópias g⁻¹ solo seco enquanto a amostra sem restrição obteve 6,67E7 cópias g⁻¹ solo seco. As amostras submetidas ao estresse hídrico variaram de 1,73E7 a 4,82E7 cópias g⁻¹ solo seco e não apresentaram efeito significativo para a época. Para as amostras não submetidas a restrição de chuvas não observou-se diferença significativa entre as datas A1 (1,97E7 cópias g⁻¹ solo seco) e A2 (1,89E7 cópias g⁻¹ solo seco). Na data A3 houve um aumento do número de cópias para 3,42E7 cópias g⁻¹ solo seco que foi significantemente maior ($p < 0,05$) que A2. Na data A4, no período de maior precipitação (+P), foi obtida a maior abundância do gene (6,67E7 cópias g⁻¹ solo seco) que foi significantemente maior ($p < 0,05$) que todas as outras datas. Na data A5, parte do período seco, houve uma redução da abundância para 3,47E7 cópias g⁻¹ solo seco, mas que foi superior ($p < 0,05$) as datas A1 e A2.

Foi observado um efeito sazonal nas comunidades de arqueias no tratamento controle, o que também foi observado na literatura (REGAN et al., 2017), também é possível observar uma tendência de aumento durante o período de maior precipitação (+P) e redução com o período de menor precipitação (-p) sugerindo que este grupo de micro-organismos é sensível a mudanças na disponibilidade de água (KWON; HARAGUCHI; KANG, 2013). Já no tratamento de restrição hídrica não houve um efeito da sazonalidade na abundância das arqueias, demonstrando que mudanças no regime de precipitação alteram a dinâmica temporal deste grupo (KWON; HARAGUCHI; KANG, 2013), sendo que neste trabalho a restrição hídrica causou uma redução significativa na abundância da comunidade de arqueias durante o período de maior precipitação (+P).

O número de cópias do gene *nifH*, de bactérias fixadoras do N, variou de 4,36E7 a 12,37E7 e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) ao efeito da restrição de chuvas para nenhuma das épocas avaliadas. As amostras submetidas ao estresse hídrico variaram de 4,36E7 a 11,56E7 cópias g⁻¹ solo seco e não apresentaram efeito significativo para a época. As amostras não submetidas a restrição de chuvas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) e variaram entre 4,97E7 e 12,37E7 (Figura 12D; Tabela 8)). Outros trabalhos apontam para um efeito da sazonalidade na abundância do gene *nifH* o que não foi verificado neste estudo, estes trabalhos associaram tal variação ao efeito negativo da amônia na fixação do N, devido ao seu potencial inibitório na expressão da nitrogenase (HOUWAARD, 1978; PEREIRA E SILVA et al., 2011; REGAN et al., 2017). Ao comparar a abundância do gene *nifH* com os dados de concentração de amônia no solo obtidos por (GERMON, 2019) é possível observar que o teor de amônio no solo não apresentou grandes variações entre as amostras (1,5- 3 mg N-NH₄ kg⁻¹ solo) o que pode ser uma explicação para a ausência de efeito da sazonalidade.

6.4. Efeito das variáveis ambientais na estruturação das comunidades bacteriana e fúngica

Para avaliar o efeito das variáveis ambientais na estruturação das comunidades bacteriana e fúngica optou-se pela análise dos tratamentos separadamente, o que possibilitou a comparação de quais variáveis ambientais são responsáveis pela estruturação da comunidade nas diferentes épocas (Figura 13). Os modelo do tratamento C3 da estrutura da comunidade bacteriana e do tratamento S3 apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$) ao teste de permutação. Apesar dos outros modelos não serem significativos, optou-se pela continuidade da análise em caráter exploratório adotando-se extrema cautela ao interpretar dos resultados.

A) RDA - Bactérias

B) RDA - Fungos

Figura 13. Análise de Redundância (RDA) do perfil do T-RFLP do gene 16S de bactérias (A) e do perfil de DGGE do gene 18S de fungos das amostras de superfície (0-10 cm). Setas indicam as propriedades químicas observadas: NO₃, NH₄, N₂O, umidade. Asteriscos indicam correlações significativas ($p < 0,05$) dos atributos físicos das amostras pelo teste de permutação (999 permutações).

Para a estrutura da comunidade bacteriana, quando não submetida ao tratamento de redução de chuvas (C3) as variáveis ambientais explicaram 37,2% da variação do modelo (eixo 1: 28,8 %; eixo 2: 8,4 %). A única variável ambiental que apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) foi o teor de amônio (NH₄⁺). Quando submetida a redução de chuvas (S3) as variáveis ambientais explicaram 23,2% da variação do modelo dessa variação (eixo 1: 13,5 %; eixo 2: 9,7 %). Nenhuma variável ambiental apresentou correlações significativas (Figura 13A).

Para a estrutura da comunidade fúngica quando não submetida ao tratamento de redução de chuvas (C3) as variáveis ambientais explicaram 20,1 % da variação do modelo (eixo 1: 10,6 %; eixo 2: 9,5 %). Nenhuma variável ambiental apresentou correlações significativas. Quando submetida a redução de chuvas (S3) as variáveis ambientais explicaram 24,4 % da variação do modelo dessa variação (eixo 1: 14,6 %; eixo 2: 9,8 %). As variáveis ambientais que apresentaram correlações significativas foram o teor de amônio (NH₄⁺) e a umidade (Figura 13B).

O teor de amônio no solo foi uma dos atributos significativos na estruturação tanto da comunidade de bactérias quanto na de fungos, que pode ser um reflexo a mudanças na disponibilidade desse nutriente afetando diretamente as microbianas, e indiretamente, pela variabilidade da liberação de carbono pelas plantas com as mudanças na disponibilidade de N (LAZZARO; HILFIKER; ZEYER, 2015; YANG et al., 2017). A umidade foi outro parâmetro significativo no modelo da comunidade fúngica, o que já foi evidenciado em outros trabalhos em que mesmo pequenas mudanças na umidade são capazes de alterar a estrutura da comunidade, devido a coexistência de diferentes populações que alternam sua dominância (BROCKETT; PRESCOTT; GRAYSTON, 2012; KAISERMANN et al., 2015; LAZZARO; HILFIKER; ZEYER, 2015).

A ausência de um efeito mais expressivo da umidade na estruturação das comunidades pode estar relacionado tanto a uma adaptação fisiológica dessas comunidades (REN et al., 2018; ZHANG et al., 2013), como pela presença de outros atributos que influenciam a estruturação de maneira mais intensa. Neste estudo, os modelos gerados foram responsáveis por no máximo 37,2% da variação na estrutura microbiana, o que sugere a presença de outros fatores contribuindo para a estruturação dessas comunidades ao longo das diferentes épocas. Dentre as variáveis não analisadas o pH é um parâmetro extremamente importante, relacionado com a disponibilidade de nutrientes, e que interfere na estrutura da comunidade microbiana (BÅÅTH et al., 1995; CARDOSO; ANDREOTE, 2016), e é suscetível a variações sazonais (LAZZARO; HILFIKER; ZEYER, 2015); assim como a matéria orgânica do solo (BÅÅTH et al., 1995; CARDOSO; ANDREOTE, 2016; DRENOVSKY et al., 2004; LAZZARO; HILFIKER; ZEYER, 2015).

6.5. Indicadores Biológicos de atividade microbiana

A atividade enzimática da fosfatase ácida foi significativamente maior ($p < 0,01$) quando submetida ao estresse hídrico (S3; 363,2 mg p-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}) em comparação ao solo controle (C3: 298,2 mg p-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}) na camada 0-10 cm (D1). Nas camadas 10-20 cm e 40-50 cm não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 14A; Tabela 9). Quanto a profundidade, ambos os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento, com as profundidades apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas (Figura 14; Tabela 9A).

Tabela 9. Valores médios dos indicadores biológicos do solo.

	Fosfatase ácida		Fosfatase alcalina		β -glucosidase		CBM		RS	
	C3	S3	C3	S3	C3	S3	C3	S3	C3	S3
D1	298.2 a	363.2 a	28.76 a	32.85 a	36.67 a	46.58 a	0.1438	0.1338	1.67 a	1.60 a
	175.09	212.37								
D2	b	b	11.43 b	24.45 ab	14.26 b	20.40 b	0.1544	0.1156	0.63 b	0.68 b
	133.56	140.17								
D3	c	c	14.2 b	20.32 b	3.44 c	2.18 c	-	-	0.46 b	0.52 b

Atividade enzimática das fosfatases ácida, alcalina e da β -glucosidase (mg p-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}); CBM = Carbono da biomassa microbiana (mg C g^{-1} solo seco); RS = respiração do solo ($\mu\text{g CO}_2$ g^{-1} solo h^{-1}); C3 = controle S3 = estresse hídrico; D1 (0-10 cm); D2 (10-20 cm); D3 (40-50 cm). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada profundidade: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Letras diferentes indicam diferenças entre as profundidades de cada tratamento ($p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey).

A fosfatase alcalina não apresentou diferença significativa entre os tratamentos na camada 0 – 10 cm. Para as camadas 10-20 cm e 40-50 cm houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre C3 e S3, sendo o tratamento sob restrição o que apresentou maior atividade (Tabela 9). Quanto a profundidade, no tratamento C3 a camada 10-20 cm

apresentou maior atividade ($p < 0,05$) que as camadas inferiores, as quais não se diferenciaram; para o tratamento S3 houve diferença ($p < 0,05$) apenas entre a camada mais superficial (0-10 cm) e a camada 40-50 cm (Tabela 9; Figura 14).

O estresse hídrico foi maior ($p < 0,05$) quanto a atividade da β -glucosidase nas camadas 0-10 e 10-20 cm com 46,58 e 20,40 mg p-nitrofenol $\text{kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ respectivamente, em comparação ao controle que obteve a atividade de 36,67 e 14,26 mg p-nitrofenol $\text{kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$. Em relação ao efeito da profundidade, ambos os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento, com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada profundidade avaliada (Tabela 9; Figura 14).

Figura 14. Atividade enzimática (fosfatase ácida, alcalina e β -glucosidase), carbono da biomassa microbiana e respiração do solo em função do tratamento (C3 – controle, S3 – estresse hídrico) e profundidade (D1: 0-10 cm, D2: 10-20 cm, D3: 40-50 cm). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada profundidade, letras indicam diferenças entre as profundidades de cada tratamento ($p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey).

A atividade enzimática das três enzimas avaliadas foi maior com a redução da precipitação, sendo esse efeito mais intenso na camada superficial para a fosfatase ácida e β -glucosidase e em profundidade para a fosfatase alcalina. A maior atividade enzimática no solo em condições de precipitação reduzida também foi verificada em outros estudos (ALSTER et al., 2013; BOUSKILL et al., 2016; OCHOA-HUESO et al., 2018). Uma possível explicação é que uma das estratégias adaptativas dos micro-organismos para enfrentar condições de estresse hídrico é o investimento na produção de enzimas (MANZONI et al., 2014). Os maiores valores observados também podem estar relacionado com o incremento da matéria orgânica em função da mortalidade de raízes finas (OCHOA-HUESO et al., 2018). Embora este não pareça ser o caso aqui abordado, uma vez que no trabalho de Germon et al. (2019), realizado no mesmo sistema experimental não observou diferenças significativas na mortalidade das raízes finas. Os maiores valores da atividade enzimática também podem estar relacionados a um maior acúmulo enzimático, pois em condições de menor umidade a perda através de difusão pode ser diminuída devido a menor interconexão dos poros; além disso a menor

quantidade de água no solo pode favorecer o contato das enzimas com a matéria orgânica insolúvel, levando a sua imobilização e consequentemente proteção contra a degradação (ALSTER et al., 2013).

A menor atividade enzimática com o aumento da profundidade era esperado e já foi relatado em outros estudos, sendo associada a diminuição na abundância de micro-organismos, e dos teores dos substratos enzimáticos (FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a; HSIAO et al., 2018; KO et al., 2017). Em relação ao efeito contrastante entre as fosfatases frente a redução de chuvas, essa pode estar relacionada com o pH, sabe-se que a expressão da fosfatase ácida é maior em solos ácidos e da alcalina em alcalinos (LUO; MENG; GU, 2017). O pH do solo deste experimento (Tabela 2) aumentou em conjunto com a profundidade, sendo esperado um aumento da atividade da fosfatase alcalina e redução da ácida que pode ter contribuído para as diferenças observadas em relação a redução de chuvas.

O carbono da biomassa microbiana foi avaliado para as camadas mais superficiais do solo (0-10 e 10-20 cm) e não apresentou efeito significativo do estresse hídrico ou da profundidade, variando entre 0,1156 e 0,1544 mg C g⁻¹ solo seco (Tabela 9; Figura 14). A ausência do efeito da redução de chuvas sobre a biomassa microbiana não era esperado, visto que diversos estudos relatam a sua redução quando a precipitação é diminuída (BASTIDA et al., 2017; REN et al., 2018), devido a indução do estresse hídrico que limita o crescimento microbiano (FIERER; SCHIMEL, 2002; MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012; SCHIMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007). No entanto existem outros estudos que relatam a ausência do efeito da redução de chuvas, sendo associado a contínua emissão de carbono pelas plantas sobre estresse (BOUSKILL et al., 2013; PREECE et al., 2019; ZHOU et al., 2019). A ausência do efeito da profundidade sobre a biomassa microbiana é surpreendente visto o consenso existente da sua redução com o aumento da profundidade, a qual redução da quantidade e qualidade do carbono no solo (EILERS et al., 2012; FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a; HSIAO et al., 2018). A alta variância dos dados observados pode ter contribuído para a não observação dessa tendência, assim como uma possível presença do efeito da redução de chuvas.

A respiração do solo não foi afetada pela redução das chuvas em nenhuma das profundidades avaliadas, no entanto foi possível observar o efeito ($p < 0,05$) da profundidade em ambas as situações (C3 e S3), em que a camada 0-10 cm apresentou maior respiração (1,60 a 1,67 $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo hora⁻¹) em relação as camadas 10-20 e 40-50 cm que não apresentaram diferenças entre elas, variando entre 0,46 e 0,68 $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo hora⁻¹ (Tabela 9; Figura 14). Era esperado um efeito da restrição de chuvas sobre a respiração do solo, o que não foi observado. A estudos apontam para a redução da respiração com a redução das chuvas (LIU et al., 2016; REN et al., 2018; ZHOU et al., 2019), embora no trabalho de Zhou et al. (2019) não foi observada uma diferença significativa da restrição de chuvas durante o período chuvoso, período em que foi feita a amostragem do presente trabalho. Quanto ao efeito da profundidade, os resultados aqui obtidos confirmam os presentes na literatura (FIERER; SCHIMEL; HOLDEN, 2003a), vale ressaltar que respiração do solo está correlacionada com a biomassa microbiana, de modo que os resultados obtidos aqui contrastam com os da biomassa microbiana, demonstrando que a ausência do efeito da profundidade na biomassa microbiana pode ser devido a uma limitação metodológica.

7. CONCLUSÕES

A estrutura das comunidades bacteriana e fúngica se alterou em função da época e da profundidade avaliada. Para a estrutura da comunidade dos fungos não foi observado efeito da redução da precipitação. Para a estrutura da comunidade de bactérias observou-se diferenças em duas épocas avaliadas, uma no período de maior precipitação (+P) e uma no período de menor precipitação (-p), sugerindo que o efeito da restrição independe da época do ano, ao contrário da hipótese proposta. Não se observou diferenças no tratamento função da profundidade em nenhuma das estruturas microbianas avaliadas, ao contrário da hipótese proposta.

A abundância dos genes 16S de bactérias, e nifH de fixadores do N, não foram afetados pela redução das chuvas em nenhuma das épocas avaliadas. Para os genes 16S de arqueias e 18S de fungos observou-se diferença da redução de chuvas em uma época durante o período de maior precipitação (+P), confirmando a hipótese de o efeito da restrição de chuvas diminuir a abundância dessas comunidades e desse efeito ser mais intenso durante o período de maior precipitação (+P).

Das variáveis ambientais analisadas o teor de amônio se correlacionou com a estruturação da comunidade bacteriana ao longo das épocas quando não submetida a redução de chuvas, para os fungos o amônio e a umidade do solo apresentaram correlações quando em situação de redução de chuvas. Em todas as situações as variáveis ambientais explicaram a menor parte da variância, de modo que outros fatores ambientais, como o pH, podem ser responsáveis pela estruturação da comunidade, sendo interessante de se avaliar futuramente.

Quanto aos indicadores biológicos de qualidade do solo avaliados, apenas as atividades enzimáticas se mostraram responsivas ao efeito da redução de chuvas. A biomassa e a respiração do solo não apresentaram efeito do tratamento e somente a segunda apresentou efeito da profundidade, com os maiores valores em superfície. Em relação as atividades enzimáticas, todas as enzimas apresentaram atividade aumentada em situação de restrição, diminuindo com o aumento da profundidade. Confirmou-se a hipótese de que o efeito da restrição seria mais intenso em superfície para as enzimas β -glucosidase e fosfatase ácida, enquanto que a fosfatase alcalina apresentou efeito contrário (maior diferença dos tratamentos em profundidade).

Este estudo apresentou resultados que demonstram o efeito do estresse hídrico sobre a comunidade microbiana do solo, mas com menor proporção em relação as variações sazonais e da profundidade. O uso de técnicas mais apuradas como o sequenciamento podem fornecer informações importantes a respeito da filogenia da comunidade, podendo auxiliar na identificação de funções ecossistêmicas que possam ser afetadas.

REFERÊNCIAS

- ALSTER, C. J. et al. Microbial enzymatic responses to drought and to nitrogen addition in a southern California grassland. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 64, p. 68–79, 2013.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland - Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1121–1132, nov. 2003.
- AZZIZ, G. et al. nirS- and nirK-type denitrifier communities are differentially affected by soil type, rice cultivar and water management. **European Journal of Soil Biology**, v. 78, p. 20–28, jan. 2017.
- BÅÅTH, E. et al. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 229–240, fev. 1995.
- BASTIDA, F. et al. Differential sensitivity of total and active soil microbial communities to drought and forest management. **Global Change Biology**, v. 23, n. 10, p. 4185–4203, out. 2017.
- BATTIE-LACLAU, P. et al. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. **New Phytologist**, v. 203, n. 2, p. 401–413, jul. 2014.
- BEIER, C. et al. Precipitation manipulation experiments - challenges and recommendations for the future. **Ecology Letters**, v. 15, n. 8, p. 899–911, ago. 2012.
- BELLO, M. O. et al. Differential sensitivity of ammonia oxidising archaea and bacteria to matric and osmotic potential. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 129, n. July 2018, p. 184–190, fev. 2019.
- BINKLEY, D. et al. The interactions of climate, spacing and genetics on clonal *Eucalyptus* plantations across Brazil and Uruguay. **Forest Ecology and Management**, v. 405, n. September, p. 271–283, 2017.
- BLOTTA, I. et al. Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 41, n. 1, p. 119–23, 2005.
- Borralho, N., Gaspar, A., Neto, C.P., 2018. What's beyond wood fibre for eucalypt industrial plantations. In: **Proceedings of the 2018 Eucalyptus Conference**, Montpellier, France, p. 5. Doi: 10.19182/agritrop/00023.
- BOUSKILL, N. J. et al. Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought. **The ISME Journal**, v. 7, n. 2, p. 384–394, 15 fev. 2013.
- BOUSKILL, N. J. et al. Belowground response to drought in a tropical forest soil. I. Changes in microbial functional potential and metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.
- BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K. P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3769–75, out. 1998.
- BROCKETT, B. F. T.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. 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, n. 1, p. 9–20, jan. 2012.

BÜNEMANN, E. K. et al. Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, n. September 2017, p. 105–125, 2018.

BUONGIORNO, J.; GILLES, J. K. **methods for forest resource management**. [s.l.] Elsevier, 2003.

CARDOSO, E. J. B. N. et al. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 274–289, ago. 2013.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2016.

CARSON, J. K. et al. Low Pore Connectivity Increases Bacterial Diversity in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3936–3942, 15 jun. 2010.

CASTRILLO, G. et al. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. **Nature**, v. 543, n. 7646, p. 513–518, 2017.

CHRISTINA, M. et al. Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. **Global Change Biology**, v. 21, n. 5, p. 2022–2039, maio 2015.

CHURCHLAND, C.; GRAYSTON, S. J. Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–20, 3 jun. 2014.

CREGGER, M. A. et al. Response of the Soil Microbial Community to Changes in Precipitation in a Semiarid Ecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8587–8594, 15 dez. 2012.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Journal of Visualized Experiments**, n. 45, p. 1–5, 22 nov. 2010.

DICKIE, I. A.; FITZJOHN, R. G. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: A methods review. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 4, p. 259–270, 2007.

DODDS, W. K. et al. Biological properties of soil and subsurface sediments under abandoned pasture and cropland. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 837–846, jul. 1996.

DORAN, J. W.; SAFLEY, M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: PANKHURST, C.; DOUBE, B.; GUPTA, V. V. S. R. (Eds.). **Biological Indicators of Soil Health**. 1. ed. [s.l.] CAB International, 1997. p. 1–28.

DRENOVSKY, R. E. et al. Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 424–430, 2004.

EILERS, K. G. et al. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 58–65, 2012.

ENGELBRECHT, B. M. J. et al. Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. **Nature**, v. 447, n. 7140, p. 80–82, 2007.

FAO. **World reference base for soil resources**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.

FELSMANN, K. et al. Soil Bacterial Community Structure Responses to Precipitation Reduction and Forest Management in Forest Ecosystems across Germany. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122539, 14 abr. 2015.

FIERER, N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 17 jan. 2006.

FIERER, N.; SCHIMEL, J. P. Effects of drying–rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 777–787, jun. 2002.

FIERER, N.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 167–176, 2003a.

FIERER, N.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. A. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. **Microbial Ecology**, v. 45, n. 1, p. 63–71, 2003b.

FRY, E. L. et al. Soil multifunctionality and drought resistance are determined by plant structural traits in restoring grassland. **Ecology**, v. 99, n. 10, p. 2260–2271, 2018.

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. e42149, 25 jul. 2012.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113–118, abr. 1993.

GEISEN, S. et al. A methodological framework to embrace soil biodiversity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 136, p. 107536, set. 2019.

GERMON, A. **Consequences of clear-cutting on the production of fine roots, CO₂, CH₄ and N₂O down to the water table in *Eucalyptus grandis* stands conducted in coppice in a throughfall - exclusion experiment**. 2019. Tese (Doutorado em Ecologia Funcional) - Université de Montpellier em parceria com a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2019.

GERMON, A. et al. Consequences of clear-cutting and drought on fine root dynamics down to 17 m in coppice-managed eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 445, n. February, p. 48–59, ago. 2019.

GÖCKE, M. I. et al. Disentangling interactions between microbial communities and roots in deep subsoil. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 135–145, 2017.

GONÇALVES, J. L. DE M. et al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6–27, 2013.

GU, Y. et al. Long-term fertilization structures bacterial and archaeal communities along soil depth gradient in a paddy soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–15, 2017.

HABEKOST, M. et al. Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 2588–2595, 2008.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HARTEMINK, A. E. The definition of soil since the early 1800s. In: **Advances in Agronomy**. [s.l.] Academic Press, 2016. v. 137p. 73–126.

HAWKES, C. V. et al. Fungal community responses to precipitation. **Global Change Biology**, v. 17, n. 4, p. 1637–1645, 2011.

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.

HENRY, H. A. L. Soil extracellular enzyme dynamics in a changing climate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 47, p. 53–59, 2012.

HICKS, L. C. et al. The legacy of mixed planting and precipitation reduction treatments on soil microbial activity, biomass and community composition in a young tree plantation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 124, n. May, p. 227–235, set. 2018.

HOUWAARD, F. Influence of ammonium chloride on the nitrogenase activity of nodulated pea plants (*Pisum sativum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1061–1065, 1978.

HSIAO, C.-J. et al. Vertical changes of soil microbial properties in claypan soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 121, n. September 2017, p. 154–164, jun. 2018.

HU, L. et al. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

IBÁ. **Relatório 2019 Indústria Brasileira de Árvores**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 21 mai. 20.

IBGE, 2019. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/tabelas>. Acesso em 21 mai. 20..

ILSTEDT, U.; NORDGREN, A.; MALMER, A. Optimum soil water for soil respiration before and after amendment with glucose in humid tropical acrisols and a boreal mor layer. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1591–1599, 2000.

ISERMAYER, H. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. **Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung Bodenkunde**, v. 56, n. 1–3, p. 26–38, 1952.

JENTSCH, A. et al. Climate extremes initiate ecosystem-regulating functions while maintaining productivity. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 689–702, 2011.

JONES, D. L. et al. Microbial competition for nitrogen and carbon is as intense in the subsoil as in the topsoil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 117, n. October 2017, p. 72–82, fev. 2018.

KAISERMANN, A. et al. Fungal communities are more sensitive indicators to non-extreme soil moisture variations than bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 158–164, 2015.

KANDELER, Ellen *et al.* Nitrogen Cycle Enzymes. In: DICK, Richard P. **Methods of Soil Enzymology**. 9. ed. Madison, WI: Soil Science Society of America, 2011. cap. 10, p. 211–245

- KARCZEWSKI, K.; RISS, H. W.; MEYER, E. I. Comparison of DNA-fingerprinting (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems. **Limnologica**, v. 67, n. November, p. 45–53, 2017.
- KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–13, jan. 2010.
- KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1358–1373, dez. 2013.
- KO, D. et al. Bacterial and fungal community composition across the soil depth profiles in a fallow field. **Journal of Ecology and Environment**, v. 41, n. 1, p. 34, 2017.
- KOU, D. et al. Diverse responses of belowground internal nitrogen cycling to increasing aridity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, n. October 2017, p. 189–192, 2018.
- KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018.
- KWON, M. J.; HARAGUCHI, A.; KANG, H. Long-term water regime differentiates changes in decomposition and microbial properties in tropical peat soils exposed to the short-term drought. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 33–44, 2013.
- LAMBAIS, M. R. et al. Tópicos em ciência do solo. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 43–84.
- LAUBER, C. L. et al. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **ISME Journal**, v. 7, n. 8, p. 1641–1650, 2013.
- LAZZARO, A.; HILFIKER, D.; ZEYER, J. structures of microbial communities in alpine soils: Seasonal and elevational effects. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–13, 2015.
- LEE, S. B.; MCCORD, B.; BUEL, E. Advances in forensic DNA quantification: A review. **ELECTROPHORESIS**, v. 35, n. 21–22, p. 3044–3052, nov. 2014.
- LEGENDRE, P.; OKSANEN, J.; TER BRAAK, C. J. F. Testing the significance of canonical axes in redundancy analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 269–277, 2011.
- LEHTO, T.; ZWIAZEK, J. J. Ectomycorrhizas and water relations of trees: A review. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 2, p. 71–90, 2011.
- 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, C. et al. Change in deep soil microbial communities due to long-term fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 264–272, 2014.
- LI, G. et al. Precipitation affects soil microbial and extracellular enzymatic responses to warming. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, p. 212–221, maio 2018.
- LIU, L. et al. A cross-biome synthesis of soil respiration and its determinants under simulated precipitation changes. **Global Change Biology**, v. 22, n. 4, p. 1394–1405, 2016.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516–22, nov. 1997.

LOEPPMANN, S. et al. Enzyme properties down the soil profile - A matter of substrate quality in rhizosphere and detritosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 274–283, 2016.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C. et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 3, p. 399–407, jun. 2004.

LU, Y. Z. et al. The content of trace element iron is a key factor for competition between anaerobic ammonium oxidation and methane-dependent denitrification processes. **Chemosphere**, v. 198, p. 370–376, 2018.

LUO, L.; MENG, H.; GU, J. D. Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 539–549, 2017.

LUYSSAERT, S. et al. CO₂ balance of boreal, temperate, and tropical forests derived from a global database. **Global Change Biology**, v. 13, n. 12, p. 2509–2537, 2007.

MADSEN, E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 456–464, 2011.

MAGRIN, G. O. et al. Central and South America. In: BARROS, V. R. et al. (Eds.). **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation and Vulnerability**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 1499–1566.

MAHARJAN, M. et al. Effect of land use and management practices on microbial biomass and enzyme activities in subtropical top-and sub-soils. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 22–28, maio 2017.

MANZONI, S. et al. A theoretical analysis of microbial eco-physiological and diffusion limitations to carbon cycling in drying soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 73, p. 69–83, 2014.

MANZONI, S.; SCHIMEL, J. P.; PORPORATO, A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. **Ecology**, v. 93, n. 4, p. 930–938, abr. 2012.

MAQUERE, V. **Dynamics of mineral elements under a fast-growing eucalyptus plantation in Brazil . Implications for soil** AgroParisTech, 2008.

MARTINS, C. S. C. et al. Water availability and abundance of microbial groups are key determinants of greenhouse gas fluxes in a dryland forest ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 86, p. 5–16, 2015.

MGANGA, K. Z.; RAZAVI, B. S.; KUZUYAKOV, Y. Land use affects soil biochemical properties in Mt. Kilimanjaro region. **Catena**, v. 141, p. 22–29, 2016.

MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 16, n. 3, p. 177–184, mar. 1995.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

- NA, X. et al. Vegetation biomass and soil moisture coregulate bacterial community succession under altered precipitation regimes in a desert steppe in northwestern China. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 107520, 2019.
- NIE, S. et al. Anaerobic ammonium oxidation in agricultural soils-synthesis and prospective. **Environmental Pollution**, v. 244, p. 127–134, jan. 2019.
- NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. K. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 276–289, 31 jul. 2007.
- NUNAN, N. et al. Links between Plant and Rhizoplane Bacterial Communities in Grassland Soils, Characterized Using Molecular Techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6784–6792, 1 nov. 2005.
- OCHOA-HUESO, R. et al. Drought consistently alters the composition of soil fungal and bacterial communities in grasslands from two continents. **Global Change Biology**, v. 24, n. 7, p. 2818–2827, 2018.
- OCHSENREITER, T. et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 787–797, set. 2003.
- OLIVEIRA, J. T. S. et al. Caracterização da madeira de sete espécies de eucaliptos para a construção civil: 1 - Avaliações dendrométricas das árvores. **Scientia Forestalis**, n. 56, p. 113–124, 1999.
- PAJARES, S.; BOHANNAN, B. J. M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–20, 2016.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633–1644, 11 out. 2007.
- PEREIRA, A. P. DE A. et al. Shifts in the bacterial community composition along deep soil profiles in monospecific and mixed stands of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180371, 7 jul. 2017.
- PEREIRA E SILVA, M. C. et al. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, n. 1, p. 57–68, jul. 2011.
- PRADIER, C. et al. Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil. **Plant and Soil**, v. 414, n. 1–2, p. 339–354, 6 maio 2017.
- PREECE, C. et al. Effects of past and current drought on the composition and diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, n. December 2018, p. 28–39, abr. 2019.
- PRÉVOST-BOURÉ, N. C. et al. Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24166, 8 set. 2011.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, , 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RAHMAN, M. M. et al. Effects of drought legacy and tree species admixing on bacterial growth and respiration in a young forest soil upon drying and rewetting. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 127, n. September, p. 148–155, dez. 2018.

RAMETTE, A. Quantitative Community Fingerprinting Methods for Estimating the Abundance of Operational Taxonomic Units in Natural Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2495–2505, 15 abr. 2009.

REGAN, K. et al. Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in an unfertilized grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 109, p. 214–226, 2017.

REN, C. et al. Responses of soil total microbial biomass and community compositions to rainfall reductions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, n. September 2017, p. 4–10, jan. 2018.

RICHARD, F. et al. Ectomycorrhizal communities in a Mediterranean forest ecosystem dominated by *Quercus ilex*: seasonal dynamics and response to drought in the surface organic horizon. **Annals of Forest Science**, v. 68, n. 1, p. 57–68, 22 jan. 2011.

ROBIN, A. et al. How deep can ectomycorrhizas go? A case study on *Pisolithus* down to 4 meters in a Brazilian eucalypt plantation. **Mycorrhiza**, p. 637–648, 2019.

ROTHAUWE, J.; WITZEL, K. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker : Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. v. 63, n. 12, p. 4704–4712, 1997.

SANDAA, R.-A.; ENGER, Ø.; TORSVIK, V. Rapid method for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 265–268, fev. 1998.

SANTOS, H. G. DOS et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 4. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

SCHIMMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, jun. 2007.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. . Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1–3, p. 255–262, set. 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SCHÜTTE, U. M. E. et al. Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1258–1268, 9 nov. 2009.

SCHUTTER, M. E.; SANDENO, J. M.; DICK, R. P. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 6, p. 397–410, 2001.

SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. **Climate Dynamics**, v. 31, n. 1, p. 79–105, 27 jul. 2008.

SILVEIRA, R. D. A. et al. Levantamento nutricional de florestas de *Eucalyptus grandis* da região de Itatinga-sp. I. Macronutrientes. **Congresso brasileiro de ciência do solo**. Anais. Viçosa: UFV, 1995.

- SINGER, V. L. et al. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n. 2, p. 228–238, 1997.
- SMETHURST, P. J. Forest fertilization: Trends in knowledge and practice compared to agriculture. **Plant and Soil**, v. 335, n. 1, p. 83–100, 2010.
- SMIT, E. et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2614–21, jun. 1999.
- SOLOMON, S. et al. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 106, n. 6, p. 1704–1709, 2009.
- STAPE, J. L. et al. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 9, p. 1684–1694, abr. 2010.
- STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R94–R98, 2016.
- STONE, M. M.; DEFOREST, J. L.; PLANTE, A. F. Changes in extracellular enzyme activity and microbial community structure with soil depth at the Luquillo Critical Zone Observatory. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 237–247, 2014.
- TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: BOTTOMLEY, P. S.; ANGLE, J. S.; WEAVER, R. W. (Eds.). **Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 775–833.
- TAKETANI, R. G. et al. Dry Season Constrains Bacterial Phylogenetic Diversity in a Semi-Arid Rhizosphere System. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 1, p. 153–161, 24 jan. 2017.
- THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. **Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers**.
- TOURNA, M. et al. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1357–1364, 2008.
- TOURNIER, E. et al. Modification of a commercial DNA extraction kit for safe and rapid recovery of DNA and RNA simultaneously from soil, without the use of harmful solvents. **MethodsX**, v. 2, p. 182–191, 2015.
- TRIVEDI, C. et al. Losses in microbial functional diversity reduce the rate of key soil processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 135, n. April, p. 267–274, ago. 2019.
- VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant, Soil and Environment**, v. 55, n. No. 10, p. 413–423, 21 out. 2009.
- VAN DE GRAAF, A. A. et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 2187–2196, 1 ago. 1996.
- VAN DORST, J. et al. Community fingerprinting in a sequencing world. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 2, p. 316–330, ago. 2014.
- VAN KESSEL, M. A. H. J. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 26 dez. 2015.

- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, jan. 1987.
- WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5266–5270, 8 abr. 2014.
- WANG, Y.; FUJII, T. Evaluation of Methods of Determining Humic Acids in Nucleic Acid Samples for Molecular Biological Analysis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 355–357, 23 fev. 2011.
- WHITE, D. A. et al. Managing productivity and drought risk in *Eucalyptus globulus* plantations in south-western Australia. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 1, p. 33–44, 2009.
- WHITE, D. A. et al. Managing for water-use efficient wood production in *Eucalyptus globulus* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 331, p. 272–280, 2014.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). . **PCR Protocols a Guide to Methods and Applications**. Academic P ed. London: Elsevier, 1990. p. 315–322.
- WILCOX, K. R. et al. Contrasting above- and belowground sensitivity of three Great Plains grasslands to altered rainfall regimes. **Global Change Biology**, v. 21, n. 1, p. 335–344, 2015.
- XU, S. et al. Ubiquity, diversity, and activity of comammox *Nitrospira* in agricultural soils. **Science of The Total Environment**, v. 706, p. 135684, mar. 2020.
- YANG, S. et al. Variations in soil microbial community composition and enzymatic activities in response to increased N deposition and precipitation in Inner Mongolian grassland. **Applied Soil Ecology**, v. 119, n. 72, p. 275–285, 2017.
- YU, S. et al. The factors affecting the reproducibility of micro-volume DNA mass quantification in Nanodrop 2000 spectrophotometer. **Optik**, v. 145, p. 555–560, 2017.
- YUSTE, J. C. et al. Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. **Global Change Biology**, v. 17, n. 3, p. 1475–1486, mar. 2011.
- ZEHR, J. P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539–554, jul. 2003.
- ZHANG, B. et al. Asymmetric sensitivity of ecosystem carbon and water processes in response to precipitation change in a semi-arid steppe. **Functional Ecology**, v. 31, n. 6, p. 1301–1311, 2017.
- ZHANG, N. et al. Soil microbial responses to warming and increased precipitation and their implications for ecosystem C cycling. **Oecologia**, v. 173, n. 3, p. 1125–1142, 5 nov. 2013.
- ZHENG, L. et al. Occurrence and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from the surface to below the water table, in deep soil, and their contributions to nitrification. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 4, p. 1–8, 2017.
- ZHOU, L. et al. Soil respiration after six years of continuous drought stress in the tropical rainforest in Southwest China. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 107564, 2019a.
- ŽIFČÁKOVÁ, L. et al. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 288–301, jan. 2016.

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo de extração DNA – *MP Fast DNATM* modificado (TOURNIER et al., 2015).

1. Pesar 0,750 g de solo e adicionar ao tubo *Lysing Matrix E*.
2. Adicionar 978 µL de *Sodium Phosphate Buffer*.
3. Adicionar 122 µL do *MT Buffer*, inverter os tubos cerca de 3 vezes para a mistura dos reagentes.
4. Agitar os tubos em um *Vortex* por 10 minutos em velocidade máxima.
5. Centrifugar os tubos a 14.000 x g por 10 minutos.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL.
7. Adicionar aos tubos 250 µL da solução PPS e misturar invertendo os tubos a mão 10 vezes.
8. Centrifugar a 14.000 x g por 5 minutos.
9. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2,0 mL.
10. Adicionar 1 mL da solução DNA *binding Matrix*.
11. Misturar os tubos invertendo a mão por 10 minutos.
12. Centrifugar a 14.000 x g por 2 minutos.
13. Descartar o sobrenadante, com cuidado para manter o pellet intacto (*binding matrix* com DNA).
Obs guanidina é tóxica, realizar os procedimento em que ela é utilizada na capela e com luvas nitrílicas
14. Adicionar 500 µL de tiocianato de guanidina 5,5 M, suspender o *pellet* até obter uma solução homogênea.
15. Transferir a solução para o *SpinTM Filter* e centrifugar a 14.000 x g por 1 min. Descartar o filtrado em local apropriado.
16. Adicionar 500 µL da solução *SEWS-M* e suspender a matriz delicadamente.
17. Centrifugar a 14.000 x g por 1 min. Descartar o filtrado em local apropriado.
18. Centrifugar a 14.000 x g por 2 min.
19. Secar ao ar livre por 5 min.
20. Suspender delicadamente a matriz com 50-100 µL da solução DES.
21. Incubar por 15 min a 55°C.
22. Posicionar o *Spin Filter* em um novo tubo de 1,5 mL e centrifugar por 1 min a 14.000 x g. Descartar o *Spin Filter*.
24. Conservar à -20°C.

Preparação do tiocianato de guanidina 5,5 M:

Para 50 mL de solução:

1. Pesar 32,5 g de tiocianato de guanidina em um erlenmeyer.
2. Misturar sob agitação com 18 mL de água Mili-Q®.
3. Adicionar a solução em uma proveta e ajustar para o volume de 50 mL com água Mili-Q®.

Transferir o conteúdo para um frasco apropriado, envolvê-lo em papel alumínio para proteção da luz e identifica-lo de maneira apropriada (data, nome, substância tóxica). Armazenar em temperatura ambiente por no máximo 4 semanas. Caso a solução apresente coloração amarelada ela deve ser descartada de maneira apropriada.

ANEXO B.

Protocolo de Quantificação do DNA pelo reagente PicoGreen

Preparo da curva padrão:

Preparou-se 6 tubos a partir do DNA padrão ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e adição da solução TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) de modo a obter as seguintes concentrações: 2; 1; 0,2; 0,02; 0,01 e 0 ng/ μL .

Preparo da solução de trabalho TE + Picogreen

Diluiu-se a solução concentrada Quant-iT™PicoGreen® por 200 vezes na solução TE 1X. Ex.: para um volume final de 2 mL de solução de trabalho adicionar 10 μL do reagente em 1,99 mL de solução TE 1X.

Preparo da placa:

O preparo das amostras foi realizado na microplaca Applied Biosystems® MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction (Thermo Fischer Scientific, EUA).

Para os poços da curva adicionou-se 50 μL de cada ponto da concentração, de modo a obter as quantidades finais: 100, 50, 10, 1, 0,5, 0 ng de DNA.

Para os poços das amostras à serem quantificadas adicionou-se 2 μL destas e em seguida 48 μL de TE 1X.

Adicionou-se 50 μL da solução de trabalho TE + Picogreen em todos os poços.

Leitura e análise dos dados:

A leitura da placa foi realizada no equipamento StepOne™ Real Time PCR System, utilizando apenas um ciclo de 2 minutos a 25°C com a leitura da absorbância ao final do ciclo.

Para a análise do resultado utilizou-se os dados referentes a absorbância do espectro verde. Construiu-se a curva pela relação entre a quantidade total de DNA e a absorbância obtida. Pela correlação da absorbância das amostras com a curva é possível definir a quantidade de DNA presente em 2 μL da amostra e consequentemente a sua concentração.

ANEXO C.Sequência dos *primers* utilizados no trabalho.

Grupo avaliado	Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
Estrutura da comunidade por T-RFLP e DGGE				
Bactérias	16S rRNA	8fm-FAM	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - *FAM*	(SCHÜTTE et al., 2009)(
		926r	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	
Fungos	18S e ITS rRNA	EF4	GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG	(SMIT et al., 1999)
		ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(WHITE et al., 1990)
Fungos	ITS	ITS1-F	(Grampo GC)-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	(GARDES; BRUNS, 1993)
		ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(WHITE et al., 1990)
Abundância das comunidades por qPCR				
Comunidade Bactérias	16S rRNA	341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	(LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2004)
		534R	ATT ACC GCG GCT GCT GGC A	
Comunidade Fungos	18S rRNA	FR1	AIC CAT TCA ATC GGT AIT	(PRÉVOST-BOURÉ et al., 2011)
		FF390	CGA TAA CGA ACG AGA CCT	
Comunidade Arqueas	16S rRNA	771F	ACG GTG AGG GAT GAA AGC T	(OCHSENREITER et al., 2003)
		957R	CGG CGT TGA CTC CAA TTG	
Fixação N	nifH	PolF	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	(GABY; BUCKLEY, 2012)
		PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	
Nitrificação (AOA)	amoA	CrenamoA23f	ATG GTC TGG CTW AGA CG	(TOURNA et al., 2008)
		CrenamoA616r	GCC ATC CAT CTG TAT GTC CA	
Nitrificação (AOB)	amoA	AmoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	(ROTTHAUWE; WITZEL, 1997)
		AmoA-2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	
Desnitrificação	NirS	NirS2F	TAC CAC CC(C/G) GA(A/G) CCG CGC GT	(BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998)
		NirS3R	GCC GCC GTC RTG VA	

ANEXO D. Análise das coordenadas principais (PCoA) dos dados de T-RFLP do gene 16S de bactérias (A) e do perfil obtido pelo gel de DGGE do gene 18S de fungos (B)