

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FERNANDA OMETTO ASSELTA

Perspectivas do micro e macro ecossistema em uma região sob
recuperação florestal da Mata Atlântica

Piracicaba

2023

FERNANDA OMETTO ASSELTA

Perspectivas do micro e macro ecossistema em uma região sob
recuperação florestal da Mata Atlântica

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
Meio Ambiente

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

Piracicaba

2023

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Asselta, Fernanda Ometto

Perspectivas do micro e macro ecossistema em uma região sob recuperação florestal da Mata Atlântica/ Fernanda Ometto Asselta; orientadora Siu Mui Tsai. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023

114 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Ciclos biogeoquímicos 2. Comunidades vegetais 3. Microbiologia do solo – Mata Atlântica 4. Recuperação ambiental 5. Solo florestal (Recuperação) I. Título.

CDU 574.4 : 502.171

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre colocar excelentes oportunidades em meu caminho.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do CENA/USP pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e enriquecimento científico e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, a Profa. Dra. Tsai Siu Mui pelo ensinamento, suporte, credibilidade e confiança no meu trabalho.

À Fazenda Capoava por permitir que todas as coletas dessa pesquisa fossem realizadas em suas áreas, mesmo em meio a pandemia da COVID-19.

Aos meus colegas e amigas do laboratório, Julia, Deisi, Wanderlei, Jéssica, Andressa, Aline, Luis Fernando e Lucas que participaram ativamente em diferentes etapas deste trabalho, dividindo seus conhecimentos e experiências, vocês foram essenciais durante todo este período. Agradeço também aos que colaboraram em alguma das coletas, Anderson, Luis Felipe, Franciele e, novamente, Julia, Deisi e Wanderlei.

Aos funcionários do CENA e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial ao técnico Wagner pelo auxílio.

Aos meus pais que sempre me apoiaram. Por acreditarem na minha capacidade e darem todo o amparo necessário. A minha irmã Fabiana, que sempre me aconselhou e incentivou em todas as fases da minha vida e ao meu namorado, Guilherme, por todo o suporte fundamental para conclusão desta etapa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

"O Sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

ASSELTA, F. O. **Perspectivas do micro e macro ecossistema em uma região sob recuperação florestal da Mata Atlântica**. 2023. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

A Mata Atlântica é considerada um bioma de extrema importância e desempenha serviços ecossistêmicos fundamentais por toda sua região. Porém, áreas de mata nativa vêm sofrendo, durante décadas, mudanças provindas do desmatamento. Muitas dessas áreas desmatadas apresentam alto nível de degradação, causando problemas associados ao esgotamento dos nutrientes do solo, alterações em suas propriedades químicas e consequentemente alteram a microbiota presente na área. Com isso, a restauração de ecossistemas degradados tem tomado grande importância para o equilíbrio e bem-estar ambiental e humano. Portanto, o objetivo desta dissertação consiste em compreender os efeitos e mudanças causadas no solo sob práticas restaurativas em diferentes idades da Mata Atlântica visando o restabelecimento de suas funções ecológicas, com base em suas características físico-químicas e biológicas. Para isso, foram coletadas amostras em um fragmento florestal preservado (referência), além de duas áreas restauradas de diferentes idades, e uma pastagem, localizadas na Fazenda Capoava na região de Itu-SP. O primeiro estudo, analisou os microrganismos relacionados ao ciclo do nitrogênio (N) e possíveis influências das mudanças de uso do solo ao longo do tempo. As amostras coletadas foram caracterizadas quimicamente e fisicamente e, a partir do DNA total extraído, foram realizadas análises de quantificação dos genes marcadores filogenéticos 16S rRNA de Bactéria e Archaea; dos genes funcionais relacionados ao ciclo do nitrogênio *nifH*, *nirK* e *nosZ*; e sequenciamento em larga escala de amplicons dos genes 16S rRNA de Archaea e Bactéria. A partir disso, foi realizada a correlação dos dados de sequenciamento com os dados da quantificação dos genes, de forma a comparar possíveis efeitos sobre as comunidades microbianas. A área de menor disponibilidade de nutrientes foi a restauração mais jovem. De modo geral, a abundância total de bactéria representada pelo gene 16S rRNA foi maior na pastagem e a abundância total de archaeas, maior na floresta nativa. Também, a microbiota da pastagem apresentou maior diversidade quando comparada aos solos florestais. O gene *nifH* apresentou maior abundância no solo da restauração mais jovem, possivelmente ligado à fixação biológica de N desta área. Já no segundo estudo, foi feita uma avaliação integral do armazenamento de carbono (C) nos subsistemas acima e abaixo do solo, consequências para os fluxos de gases de efeito estufa (GEE) e a quantidade, qualidade e origem da matéria orgânica do solo (MOS). Estas análises revelaram que as restaurações seguiram uma

reabilitação progressiva das propriedades da MOS e da saúde do solo e que independentemente do modelo aplicado, à restauração florestal foi melhor do que a pastagem para sequestro de C e, também, para a melhoria da saúde do solo.

Palavras-chave: Comunidades microbianas. Ciclo do nitrogênio. Ciclo do carbono. Áreas restauradas.

ABSTRACT

ASSELTA, F. O. **Perspectives of the micro and macro ecosystem in a region under forest recovery of the Atlantic Forest.** 2023. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

The Atlantic Forest is considered an important biome and perform fundamental ecosystem services in the whole region. However, native forest areas have been suffering, for decades, because of the changes from deforestation. Many of these deforested areas has a high level of degradation, causing problems associated with the soil nutrients decrease, changes in their chemical properties and consequently change the microbiota present in the area. Therefore, the restoration of degraded ecosystems has taken a big importance for the balance and environmental and human well-being. The purpose of this dissertation is to understand the effects and changes caused in the soil by restorative practices at different ages of the Atlantic Forest, aiming the recovery of the ecological functions, based on its physical-chemical and biological characteristics. For this, samples were collected in a preserved forest fragment (reference), in addition to two restored areas of different ages, and a pasture, located at Fazenda Capoava in the region of Itu-SP. The first study analyzed microorganisms related to the nitrogen (N) cycle and possible influences of changes in land use over time. The collected samples were chemically and physically characterized and, based on the extracted total DNA, quantification analyzes of the 16S rRNA phylogenetic marker genes of Bacteria and Archaea were carried out; functional genes related to the nitrogen cycle *nifH*, *nirK* and *nosZ*; and large-scale sequencing of amplicons from Archaea and Bacteria 16S rRNA genes. From this, the correlation of the sequencing data with the quantification data of the genes was carried out, to compare possible effects on the microbial communities. The area with the lowest nutrient availability was the youngest restoration. In general, the total abundance of bacteria represented by the 16S rRNA gene was higher in the pasture and the total abundance of archaea was higher in the native forest. Also, the pasture microbiota showed a bigger diversity when compared to forest soils. The *nifH* gene was more abundant in the soil of the youngest restoration, possibly associate to biological N fixation in this area. In the second study, an evaluation was carried out an integral assessment of Carbon (C) storage in above to belowground subsystems, consequences for greenhouse gas (GHG) fluxes, and the quantity, quality, and origin of soil organic matter (SOM). These analyzes revealed that restorations followed a progressive rehabilitation of SOM properties and soil health and that regardless of the model applied, forest restoration was better than pasture for C sequestration and also for improving soil health. However, both restorations only became forest in the top of the soil,

because the deeper soil still carries legacies of previous historical degradation. The results indicate that the studied attributes, for the most part, differed between the reforested and pasture areas of the forest fragment, possibly because of the recovery period was not enough to restore aspects of the original forest. However, it is concluded that the integration of the soil attributes is fundamental to provide successful advances in forest restoration projects.

Keywords: Microbial communities. Nitrogen cycle. carbon cycle. Restored areas.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	Hipóteses	17
1.2.	Objetivos	17
1.2.1.	Objetivos gerais	17
1.2.2.	Objetivos específicos	17
	Referências	18
2.	COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO ASSOCIADA À CICLAGEM DO NITROGÊNIO SOB RESTAURAÇÃO FLORESTAL DA MATA ATLÂNTICA.....	21
2.1.	Introdução	24
2.2.	Material e métodos	26
2.2.1.	Áreas de estudo e tratamentos	26
2.2.2.	Expedições de campo e amostragem de solo.....	29
2.2.3.	Análise química e física de amostras do solo	30
2.2.4.	Extração de DNA de amostras do solo	30
2.2.5.	PCR quantitativo em tempo real	31
2.2.6.	Sequenciamento do gene 16S rRNA arqueal e bacteriano.....	33
2.2.7.	Análise de dados.....	33
2.3.	Resultados e Discussão	34
2.3.1.	Caracterização física e química das amostras de solo	34
2.3.2.	Estrutura, diversidade e riqueza da comunidade microbiana.....	36
2.3.3.	Abundância total e relativa das comunidades microbiana.....	39
2.3.4.	Ocupação de nicho	42
2.3.5.	Análise de rede de co-ocorrência.....	44
2.3.6.	Genes associados ao ciclo do nitrogênio.....	46
2.4.	Conclusão	50
	Referências	51
3.	O PAPEL DA RESTAURAÇÃO FLORESTAL ATIVA NO ARMAZENAMENTO DE CARBONO E PROPRIEDADES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO: UMA AVALIAÇÃO MULTICAMADA NA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA	57
3.1.	Introdução	59
3.2.	Material e Métodos	62
3.2.1.	Área de estudo e tratamentos	62

3.2.2.	Avaliação do solo	62
3.2.2.1.	Amostragem de solo	62
3.2.2.2.	Atributos químicos e físicos do solo	63
3.2.2.3.	Estoques de carbono e nitrogênio do solo e sua composição isotópica ...	64
3.2.2.4.	Índice de humificação do solo	65
3.2.2.5.	Abundância de microorganismos do solo	66
3.2.3.	Avaliação da planta	66
3.2.3.1.	Estoque de carbono das árvores	66
3.2.3.2.	Herbáceas e serapilheira: estoques de carbono e nitrogênio	67
3.2.4.	Atmosfera: avaliação de gases de efeito estufa	67
3.2.5.	Análise de dados	68
3.3.	Resultados	69
3.3.1.	Estoques de carbono e nitrogênio	69
3.3.2.	Carbono e nitrogênio em herbácea e liteira	71
3.3.3.	Teor de carbono e nitrogênio do solo	72
3.3.4.	Proporção de carbono C ₄ e C ₃ das plantas	74
3.3.5.	Índice de humificação da matéria orgânica do solo	75
3.3.6.	Relação entre frações da MOS e propriedades químicas, físicas e biológicas do solo	76
3.3.7.	Fluxos de metano e dióxido de carbono	78
3.4.	Discussão	79
3.4.1.	Sequestro de carbono e nitrogênio	79
3.4.2.	Quantidade, qualidade e origem da matéria orgânica do solo	81
3.4.3.	Relações entre frações de matéria orgânica do solo e saúde do solo	84
3.4.4.	Mitigação de emissões de gases de efeito estufa	85
3.5.	Conclusão	87
	Referências	88
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	APÊNDICES	99
	Apêndice A: Material suplementar do capítulo 1	101
	Apêndice B: Material suplementar do capítulo 2	111

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada uma das regiões mais biodiversas do mundo, abrigando mais de oito mil espécies endêmicas, o que a torna um bioma de extrema importância em escala global (Tabarelli et al., 2005). Quando preservada, a mata também desempenha serviços ecossistêmicos fundamentais, como por exemplo, regulação do fluxo de mananciais, garantia da fertilidade do solo, manutenção do equilíbrio climático, proteção contra assoreamento dos cursos d'água, erosão e escarpas de serras por toda sua região (Cardoso, 2016).

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira, alcançando o leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Tabarelli et al., 2005). Todavia, as áreas de mata nativa vêm sofrendo mudanças provindas da devastação causada pela ocupação territorial e pela exploração desordenada dos recursos naturais, o que a tornou o bioma mais devastado e ameaçado do planeta (Pinto et al., 2006), causando alta fragmentação em suas áreas, gerando perdas imensuráveis de biodiversidade e acentuado efeito de borda, pois fragmentos isolados não são capazes de manter sua estrutura e biodiversidade no longo prazo (WWF, 2014).

As florestas da Mata Atlântica têm sido substituídas durante séculos por pastagens e culturas agrícolas, que atualmente cobrem 62% da área total deste bioma. As áreas de monocultura de pastagem abrangem aproximadamente 1/3 do seu território (Gomes et al., 2019). Estima-se que mais de metade dessas áreas cobertas pelo pasto estejam degradadas, causando graves problemas associados à compactação e ao esgotamento dos nutrientes do solo (Gomes et al., 2019). Já as terras ligadas às culturas agrícolas também têm gerado graves impactos ambientais quando não manejadas corretamente, como por exemplo, a erosão do solo causada por práticas de revolvimento em cultivo convencional da cana de açúcar, cultura agrícola muito presente no estado de São Paulo (Mello et al., 2020).

Baseado neste cenário, a restauração de ecossistemas degradados tem tomado grande notabilidade ao longo dos anos (Amador, 2003). A crucialidade da prática da restauração também é motivada pelos diversos desastres naturais que o mundo vem enfrentando. Isto porque sabe-se que as áreas com remanescentes de

cobertura vegetal são fundamentais para manter o equilíbrio e bem-estar ambiental e humano (Rubira, 2016).

Com isso, temas ligados a corredores ecológicos estão bastante em pauta, já que essa conexão de fragmentos florestais remanescentes é uma excelente alternativa para a conservação e manejo da diversidade de espécies. Outro tema bastante considerado para trabalhos de recuperação é o sequestro de carbono, por demandas de reflorestamentos com finalidades de fixação de C da atmosfera (Almeida, 2016).

A prática da restauração ecológica também se mostra interessante quando relacionada aos aspectos turísticos, históricos, de biodiversidade de plantas medicinais, madeireiras, ornamentais, frutíferas e para o atendimento às exigências legais (Almeida, 2016). De maneira geral, a restauração tem por objetivo reverter uma área degradada ao mais próximo possível da área original, tanto no aspecto estrutural quanto funcional do ecossistema. Para isso, fatores biológicos, climáticos, pedológicos e fisiográficos devem ser estudados de forma a guiar práticas de intervenção que permitam que uma comunidade evolua e a sucessão natural posteriormente ocorra (Galvão; Medeiros, 2002).

Diante do contexto supracitado, a restauração florestal surge como uma solução para remediar os danos causados pelas áreas degradadas, restabelecendo as propriedades físicas e químicas do solo e os primórdios dos ciclos bioquímicos. Por exemplo, a serapilheira e a atividade radicular das árvores são fundamentais para alavancar o funcionamento de um ecossistema, beneficiando processos como decomposição de matéria orgânica, fixação de carbono, ciclagem de nutrientes e água e degradação de compostos tóxicos (Aerts; Honnay, 2011).

A melhor estratégia para a restauração ecológica de floresta Atlântica parte de um diagnóstico amplo da área, levando em consideração elementos como a identificação das causas que levaram a degradação, proximidade aos corpos hídricos e nascentes, levantamento florístico do local, possível potencial de regeneração natural/espontânea, entre outros (Boaventura et al., 2019).

Baseando-se em tal diagnóstico, três principais metodologias restaurativas têm sido empregadas no bioma Mata Atlântica: restauração passiva, restauração ativa e restauração assistida. Tais metodologias têm sido detalhadamente descritas na literatura (Rodrigues et al., 2009; Brancalion et al., 2015; 2016). Brevemente, a metodologia passiva consiste em permitir a regeneração da floresta sem intervenção

humana, onde normalmente há presença de bancos de sementes que permitam que a floresta se restabeleça de modo espontâneo. O método ativo consiste na plantação de uma alta diversidade de espécies nativas de árvores em área total, seja por meio de sementes ou mudas, para que gradativamente a floresta alcance sua auto-perpetuação. Este método se adequa quando a área está em estágio severo de degradação ou foi submetida a longo histórico de agricultura intensificada, portanto com ausência de banco de sementes de espécies florestais no solo. Finalmente, o método assistido é utilizado principalmente em áreas próximas a fragmentos de floresta primária ou que tenha algumas árvores nativas presentes em baixa densidade no local. Na metodologia assistida o plantio de espécies nativas se faz em menores densidades populacionais quando comparado ao método ativo, aproveitando-se a resiliência intermediária da área e reduzindo-se os custos para implementar a restauração florestal.

As áreas com pastagens intensamente degradadas demandam do método de restauração ativa para restabelecer o funcionamento ecossistêmico em direção ao estado da floresta primária original. Nas pastagens degradadas do bioma Mata Atlântica o longo histórico de distúrbios intensivos levou a severos danos à saúde do solo e à extinção de bancos de sementes de espécies nativas da Mata Atlântica (Crouzeilles et al., 2017). Diante desta situação, plantar mudas em área total tem sido a técnica de restauração ativa mais utilizada por estudiosos da ecologia da restauração, utilizando sempre espécies nativas dos diferentes grupos sucessionais com o intuito de recompor a estrutura arbórea das áreas florestais (WWF, 2014).

Simultaneamente ao restabelecimento do dossel florestal, a restauração precisa retomar o funcionamento do ecossistema abaixo da superfície do solo. Restabelecer a saúde do solo é a fundação para construir um ecossistema edáfico funcional e resiliente, apto a manter auto-perpetuação florestal no futuro (Nolan et al., 2021). Infelizmente, a pesquisa científica sobre a restauração da Mata Atlântica tem se concentrado na dinâmica sobre a superfície do solo, pois 59% dos estudos da literatura não incluíram sequer um indicador de qualidade do solo (Mendes et al., 2019). Diante dessa lacuna, diversos pesquisadores têm encorajado a priorizar o solo no centro de projetos e estudos da restauração ecológica (Mendes et al., 2019; Nolan et al., 2021).

O funcionamento do solo e a sua saúde, pode ser estudado por meio de indicadores de três grupos ou componentes: (i) físicos, como textura, espessura, densidade do solo, resistência à penetração, porosidade, capacidade de retenção d'água, condutividade hidráulica e estabilidade de agregados; (ii) químicos, como teor de matéria orgânica do solo, a acidez do solo, o conteúdo de nutrientes, elementos fitotóxicos (acidez trocável (Al^{3+}), por exemplo) e determinadas relações como a saturação de bases (V%) e de alumínio (m); e (iii) biológicos, podendo-se citar a biomassa microbiana do solo, o nitrogênio mineralizável, a respiração microbiana do solo, a atividade enzimática e o quociente metabólico (Araújo et al., 2012).

Dentre os indicadores acima a matéria orgânica é considerada como indicador chave pois dá suporte a múltiplos processos, sendo a fonte de energia para a diversidade funcional biológica do solo (Bieluczyk et al., 2020). A MOS é composta basicamente por cerca de 52 a 58% de Carbono, 34 a 39% de Oxigênio (O), 3,3 a 4,8% de Hidrogênio (H) e de 3,7 a 4,15% de Nitrogênio, entre outros, porém em menores quantidades. Sendo que o C e o N são seus principais componentes e seus estoques variam conforme o manejo do solo, o que os tornam bons indicadores para verificação de possíveis alterações, já que são de fácil mensuração, mas é necessária a avaliação ao longo do tempo, para ter informações mais precisas sobre o manejo adotado (Souza, 2018).

A importância do ciclo do carbono e seus compostos é inquestionável, já que se mostram essenciais para toda matéria viva e fundamentais em processos como respiração, fotossíntese e regulação do clima. Já o nitrogênio, também essencial à vida, sendo necessário, por exemplo, na composição de moléculas orgânicas como os aminoácidos, que compõem as proteínas, e dos ácidos nucleicos (Martins et al., 2003).

Diante do exposto acima, duas áreas de restauração florestal, uma implementada em 2006 e outra em 2013, foram utilizadas para o desenvolvimento deste estudo. Adicionalmente, um fragmento florestal preservado foi utilizado como referência ideal e uma pastagem recuperada como uma possibilidade alternativa de manejo conservacionista. Todas essas áreas estão situadas na Fazenda Capoava, no município de Itu-SP. As intervenções de recuperação da pastagem degradada foram executadas com parcerias da fazenda com o SOS Mata Atlântica e o Laboratório de Ecologia e Restauração Florestal da ESALQ-USP a fim de iniciar projetos de Regularização Ambiental e turismo. Como a pastagem apresentava grau severo de

degradação, foi necessário a utilização do método ativo de restauração florestal. No decorrer do mestrado foram feitas três expedições à campo (maio e dezembro de 2020 e em fevereiro de 2021) para amostragem de solos, plantas e gases no intuito de investigar os efeitos da restauração florestal ativa em indicadores do micro- e macro ecossistema relacionados aos ciclos do C e do N, e responder às hipóteses abaixo.

1.1. Hipóteses

Diferentes usos do solo podem ocasionar mudanças na saúde do solo, devido ao fato de que podem proporcionar estresses diferenciados pela promoção de novas condições (como quantidade e disponibilidade de nutrientes, pH, umidade e temperatura). Essas mudanças e consequentes alterações causadas nas propriedades físico-químicas e biológicas do solo, podem ter o potencial de alterar as características desse solo, bem como suas funções dentro dos ciclos biogeoquímicos. Com isso, hipotetizamos que a intervenção ativa por meio de diversos modelos de restauração florestal reestrutura e reabilita características do solo como: comunidades microbianas edáficas, matéria orgânica do solo, mitigação de emissões de gases de efeito estufa, assim, restabelecendo serviços no solo e favorecendo a ciclagem e sequestro de carbono e nitrogênio em comparação com o ecossistema modelo de floresta primária da Mata Atlântica.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos gerais

Neste trabalho, objetivamos compreender os efeitos e mudanças causadas no solo sob práticas restaurativas em diferentes idades de áreas da Mata Atlântica. Visando o restabelecimento de funções ecológicas importantes, tais como sequestro de carbono e fixação de nitrogênio, exercidos pelas multicamadas de floresta, utilizando-se de ferramentas moleculares e detecção da saúde do solo.

1.2.2. Objetivos específicos

- a) O objetivo do Capítulo 1 foi analisar espacial e temporalmente os processos microbianos do ciclo biogeoquímico do nitrogênio na dinâmica de solos, de floresta nativa da Mata Atlântica, além de duas áreas de recuperação florestal e pastagem, em duas estações do ano, por meio do sequenciamento

em larga escala do gene 16S rRNA e quantificação por PCR quantitativo em tempo real dos genes 16S rRNA de Archaea, 16S rRNA de Bacteria, *nifH*, *nirK* e *nosZ*. A partir desses dados, foi realizada a correlação dos dados de sequenciamento com os dados de quantificação dos genes, de forma a analisar os efeitos dos diferentes usos do solo sobre as comunidades microbianas.

b) O objetivo do Capítulo 2 foi comparar áreas de restauração florestal na Mata Atlântica para armazenamento de carbono, mitigação de emissões de gases de efeito estufa e propriedades da matéria orgânica do solo (MOS) em uma abordagem integrativa. Para isso, foram utilizadas as seguintes ferramentas: (i) quantificação de pools de C abaixo e acima do solo; (ii) frações isotópicas da MOS ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para detecção da origem e reciclagem da MOS; (iii) índice de humificação da MOS para avaliação da saúde, enfatizando o equilíbrio entre seus compartimentos; (iv) fluxos de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) do solo no campo; e, (v) influência dos parâmetros da MOS nos indicadores químicos, físicos e biológicos do solo, investigando as relações da MOS com a saúde do solo.

Referências

- Almeida, D. S. **Recuperação ambiental da mata atlântica**. 3. ed. rev. e ampl. Ilhéus: Editus, 2016. 200 p.
- Amador, D. B. Restauração de ecossistemas com sistemas agroflorestais. In: Kageyama, P. Y. et al. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Botucatu: FEPAF, 2003. p. 333-340.
- Aerts, R.; Honnay, O. Forest restoration, biodiversity and ecosystem functioning. **BMC Ecology**, v. 11, p. 1-10, 2011. doi: 10.1186/1472-6785-11-29
- Bernardi, A. (org.). **Por que o solo é tão importante quanto a água e o ar?** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2020. DOI:10.13140/RG.2.2.22680.21762
- Bieluczyk, W. et al. Integrated farming systems influence soil organic matter dynamics in southeastern Brazil. **Geoderma**, v. 371, art. 114368, 2020. doi: 10.1016/j.geoderma.2020.114368
- Boaventura, de J. K. et al. Recuperação de áreas degradadas no Brasil: conceito, história e perspectivas. **Tecnia**, v. 4, n. 1, p. 124-145, 2019.
- Cardoso, J. T. A Mata Atlântica e sua conservação. **Encontros Teológicos**, v. 31, n. 3, p. 441-458, 2016.

Crouzeilles, R. et al. Ecological restoration success is higher for natural regeneration than for active restoration in tropical forests. **Science Advances**, v. 3, p. 1–8, 2017.

De Souza, E. D. et al. Matéria orgânica do solo em sistemas integrados de produção agropecuária no Brasil. In: De Souza, E. D. et al. **Sistemas Integrados de Produção Agropecuária no Brasil**. 1. ed. Tubarão, SC: Ed. Copiart, 2018. cap. 7, p. 107-122.

Galvão, A. P. M.; Medeiros, A. C. de S. **Restauração da Mata Atlântica em áreas de sua primitiva ocorrência natural**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2002. 134 p.

Gomes, T. F. et al. Runoff, soil loss, and sources of particulate organic carbon delivered to streams by sugarcane and riparian areas: An isotopic approach. **Catena**, v. 181, p. 1-9, 2019.

Nolan, M. et al. From the ground up: prioritizing soil at the forefront of ecological restoration. **Restoration Ecology**, v. 29, p. 1–5, 2021. doi: 10.1111/rec.13453

MARTINS, C. R. et al. Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 5, p. 28-41, 2003.

Mello, K. et al. Multiscale land use impacts on water quality: Assessment, planning, and future perspectives in Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 270, p. 1-16, 2020. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110879.

Mendes, M. S. et al. Look down - there is a gap - the need to include soil data in Atlantic Forest restoration. **Restoration Ecology**, v. 27, p. 361–370, 2019.

Pinto, L. P. et al. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. In: Rocha, C. F. D. et al. **Biologia da conservação: essências**. São Carlos: Rima, 2006. cap. 4, p. 91-118.

Rubira, F. G. Definição e diferenciação dos conceitos de áreas verdes/espços livres e degradação ambiental/impacto ambiental. **Caderno de Geografia**, v. 26, n. 45, p. 134-150, 2016.

Tabarelli, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 133-138, 2005.

WWF Brasil. **Restauração ecológica no Brasil: Desafios e oportunidades**. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/?60742/Restaurao-ecologica-no-Brasil-desafios-e-oportunidades> Acesso em: 24 abr 2022.

2. COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO ASSOCIADA À CICLAGEM DO NITROGÊNIO SOB RESTAURAÇÃO FLORESTAL DA MATA ATLÂNTICA

Resumo

A Mata Atlântica, considerada um dos biomas mais ricos do planeta, vem sendo, há muitas décadas, desmatada e convertida para outros usos da terra. Essas mudanças são responsáveis por modificações nas propriedades químicas do solo e conseqüentemente alteram a microbiota presente nesses ambientes. No entanto, o impacto dessas alterações ao longo do tempo ainda permanece pouco esclarecido, principalmente em ambientes tropicais. A microbiota do solo exerce um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas, responsáveis por diversas atividades, desde a ciclagem de nutrientes até a decomposição de resíduos vegetais e formação de matéria orgânica. Grande parte dos nutrientes encontrados no solo não estão disponíveis de forma absorvível pelas plantas, sendo necessária a atuação de microrganismos nesses processos chamados biogeoquímicos, como por exemplo, o ciclo do nitrogênio (N). A fixação biológica de N e a desnitrificação são alguns dos processos responsáveis por controlar o fluxo de entrada e saída do N no ambiente e são mediados pela microbiota do solo. Com base na hipótese de que microrganismos relacionados ao ciclo do N em solos tropicais são influenciados pelas mudanças de uso do solo ao longo do tempo, o presente estudo teve como objetivo analisar espacial e temporalmente os processos microbianos deste ciclo na dinâmica de solos em duas estações do ano. Os solos foram coletados em áreas com diferentes idades de restauro, utilizando um fragmento florestal preservado como referência, além de duas áreas restauradas com 7 e 14 anos e uma pastagem, localizadas na região de Itu-SP, visando a comparação da microbiota de áreas de restauração florestal na Mata Atlântica. Os solos coletados foram caracterizados química e fisicamente e, a partir do DNA total extraído das amostras, foram realizadas análises de quantificação dos genes marcadores filogenéticos 16S rRNA de Bacteria e Archaea; dos genes funcionais *nifH*, *nirK* e *nosZ*; e sequenciamento em larga escala de amplicons dos genes 16S rRNA de Archaea e Bacteria. A partir desses dados, foi realizada a correlação dos dados de sequenciamento com os dados de quantificação dos genes, de forma a analisar os efeitos dos diferentes usos do solo sobre as comunidades microbianas. A área de menor disponibilidade de nutrientes, quando comparada às demais, foi a restauração mais jovem (7 anos). De modo geral, a abundância total de bactéria representadas pelos genes 16S rRNA, foi maior na área de pastagem e a abundância total de archaeas, maior na floresta nativa. Também, a microbiota do solo de pastagem apresentou uma maior diversidade quando comparada aos solos florestais. O gene *nifH* apresentou maior abundância no solo da restauração de 7 anos, ligado à fixação biológica de N nesta área. Os resultados obtidos

apontam que os atributos estudados, em sua maioria, diferiram as áreas reflorestadas e sob pastagem do fragmento florestal, possivelmente, porque o período de recuperação não foi suficiente para restabelecer aspectos da floresta original. Porém, conclui-se que a integração de atributos do solo é fundamental para fornecer avanços bem-sucedidos em projetos de restauração ecológica.

Palavras-chave: Uso do solo. Restauração florestal. Diversidade microbiana. Ciclo biogeoquímico do nitrogênio. Sequenciamento de amplicon.

Abstract

The Atlantic Forest, considered one of the richest biomes of the planet, has been, in many decades, deforested and converted to other uses of the land. These changes are responsible for the alteration of the chemical properties of the land and consequently, it changes the microbiota present in these environments. However, the impact of these changes over the years, still aren't clarified, mainly in tropical environment. The soil microbiota has a key role for the ecosystem, responsible for many activities since the nutrient cycling to plant residues decomposition and organic material. Most of the nutrients found in the soil aren't available in an absorbable way to the plant, what makes necessary the microorganism performance in this process called biogeochemical, for example, the nitrogen cycle (N). The biological nitrogen fixation and the denitrification are some of the processes responsible for control the N in and out flow in the environment and they are mediated to the soil microbiota. Based on the hypothesis that microorganisms related to the N cycle in tropical soils are influenced by changes in land use over time, the present study was aimed to analyze spatially and temporally the microbial processes of this cycle in soil dynamics in two seasons of the year. The soil was collected in areas with different ages of restoration, using a preserved forest fragment as a reference, in addition to two restored areas with 7 and 14 years old and a pasture, located in the region of Itu-SP, to compare the microbiota of forest restoration areas in the Atlantic Forest. The collected soil was chemically and physically characterized and, based on the total DNA extracted from the samples, analyzes were carried out to quantify the 16S rRNA phylogenetic marker genes of the Bacteria and Archaea; the functional genes *nifH*, *nirK* and *nosZ*; and large-scale sequencing of amplicons from Archaea and Bacteria 16S rRNA genes. From these data, it was done the correlation of the sequencing data with the quantification data of the genes, to analyze the effects of the different land uses on the microbial communities. The area with less nutrients disponible, when compared to the others, it was a younger restoration (7 years). In general, the bacteria total abundance represented by the 16S rRNA genes, was higher in the pasture area and the total abundance of archaea was higher in the native forest. Also, the soil microbiota of the pasture has a higher diversity when compared to the forest soil. The gene *nifH* was more abundant in the 7 years restored soil, attached to the N biological fixation in this area. The results show that the studied points, in the most, differed the reforested areas and pasture to the forest fragment, possible, because the recuperation period it was not enough to restore aspects of the original forest. However, it is concluded that the integration of soil attributes is fundamental to provide successful advances in ecological restoration projects.

Keywords: Use of the soil. Forest restoration. Microbial diversity. Nitrogen biogeochemical cycle. Amplicon sequencing.

2.1. Introdução

A cobertura original da Mata Atlântica tem sido vastamente removida e convertida para outros usos da terra desde a colonização, com agravamento nos séculos seguintes, acompanhando a história econômica do Brasil (Pereira, 2009). Tal devastação foi proveniente da industrialização, do crescimento populacional e da expansão de áreas urbanas e agrícolas (Laurance, 2009).

Estudos estimam que atualmente apenas 12,4% da cobertura florestal atlântica permanece intacta (SOS Mata Atlântica, 2020) e tais áreas se distribuem em pequenas ilhas de vegetação, circundadas por áreas urbanas, agrícolas e/ou degradadas (Joly; Metzger; Tabarelli, 2014). Esta devastação resultou na fragmentação dos habitats, erosão da biodiversidade e perda da resiliência dos ecossistemas, ameaçando milhares de espécies endêmicas e tornando este bioma um dos *hotspots* (uma das prioridades para a conservação) de biodiversidade do mundo (Myers et al., 2000).

Cerca de 85% das paisagens do domínio do bioma Mata Atlântica não florestado apresentam baixa resiliência, devido aos longos períodos de agricultura, com destaque para áreas de pastagens e cana-de-açúcar (Tambosi et al., 2014). Por isso, somente abandonar e isolar essas áreas, como é o caso da metodologia passiva de restauração, não provoque efeitos eficientes na restauração ecológica da floresta e levaria a um estado estável final diferente do original (Poorter et al., 2016).

Essas áreas degradadas, como pastagens não manejadas, podem trazer muitos danos, como por exemplo, erosão e lixiviação ao longo dos anos, resultando na perda de nutrientes desses solos nesses processos (Carvalho et al., 2017). Contudo, é possível reverter a degradação dessas áreas de pastagens abandonadas. Segundo Oliveira e Corsi (2005), em um estudo sobre recuperação de pastagens, a biodiversidade desses ambientes e a reestruturação física é possível por meio de intervenções humanas como a correção da acidez do solo, adubação, plantio de espécies mais adaptadas a esses ambientes, bem como a associação com agricultura e floresta.

Porém, no caso da restauração ecológica, essa reversão torna-se mais complexa. Já que existe a difícil missão de restabelecer o funcionamento e a manutenção de um determinado ecossistema para que se formem florestas viáveis capazes de prestar os serviços ambientais, de conservação de biodiversidade ou de fornecimento de produtos florestais almejados (Brancalion et al., 2010).

Diante do exposto, torna-se fundamental o conhecimento do protagonismo do solo para o funcionamento do ecossistema, bem como compreender a atuação dos organismos vivos que o habitam, impactando tanto a construção quanto a manutenção da qualidade desse solo. Com isso, metodologias para a avaliação de indicadores biológicos, como abundância e diversidade de microrganismos e suas atividades, estão sendo cada vez mais empregadas (Sobucki et al., 2019).

Esses indicadores biológicos de qualidade do solo são importantes tanto no que se refere à ciclagem dos nutrientes, como também na estimativa da capacidade do solo para o crescimento vegetal (Araújo et al., 2012). Os organismos constituintes da biota do solo, em atenção aos microrganismos, destacam-se por apresentarem respostas mais rápidas às alterações sofridas em seu ecossistema (Oliveira et al., 2021). Em alguns casos, alterações na população e na atividade microbiana podem preceder mudanças nas propriedades químicas e físicas, refletindo um claro sinal na melhoria ou na degradação do solo (Araújo; Monteiro, 2007).

A microbiota dos solos também é responsável por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, degradando xenobiontes, fixando nitrogênio atmosférico, dentre outros processos necessários para o funcionamento do ecossistema (Lambais et al., 2005). Neste sentido destaca-se, além da importância da restauração florestal para a recuperação biológica da mata, o entendimento do papel dos microrganismos que atuam dentro dos ciclos biogeoquímicos, já que os processos microbianos são extremamente atuantes na dinâmica do solo da floresta, diretamente relacionados a diversos serviços ecossistêmicos.

Dentre os ciclos biogeoquímicos encontrados na natureza, destacamos o ciclo do nitrogênio, pois seu entendimento é fundamental para ideias de conservação e melhoria da qualidade produtiva do solo (Silva et al., 2010). Além disso, as respostas das plantas à variação espacial e temporal na disponibilidade desse nutriente tem sido um tópico de interesse de longa data na ecologia, já que a disponibilidade de N do solo é fortemente dependente das ações microbianas de transformação do N orgânico em compostos de N que podem ser assimilados pelas plantas (inorgânico) (Moreau et al., 2019). Outro fator importante é a modulação da atividade e a composição das comunidades microbianas do solo a partir das plantas presentes no ambiente.

O presente capítulo tem como objetivo avaliar os impactos em restaurações de áreas degradadas na abundância, composição e estrutura das comunidades microbianas na Mata Atlântica. Para isso, utilizamos o sequenciamento 16S rRNA, juntamente com a quantificação de genes marcadores de nitrogênio afim de avaliar as comunidades microbianas do solo de uma floresta nativa preservada e restauradas com diferentes idades (7 e 14 anos) após a conversão. Aqui, hipotetizamos que a conversão floresta-pastagem na Mata Atlântica afeta as comunidades microbianas, especialmente relacionadas ao ciclo N. Para testar essas hipóteses, foram abordadas as seguintes questões: (1) quais são as principais mudanças na estrutura e composição das comunidades microbianas causadas pela mudança do uso da terra? (2) como a mudança de uso da terra afeta grupos microbianos específicos relacionados ao ciclo N em cada local estudado?

2.2. Material e métodos

2.2.1. Áreas de estudo e tratamentos

As áreas de estudo foram localizadas na Fazenda Capoava (23°12'53"S, 47°10'45"W, 670 m de altitude), município de Itu, estado de São Paulo, sudeste do Brasil. O clima da região é Cwa, segundo a classificação de Köppen, subtropical com invernos secos e verões quentes e chuvosos, com 1299 mm de precipitação pluviométrica e 21,3 °C de temperatura média anual (Alvares et al., 2013). Originalmente, todas as áreas estudadas eram cobertas por uma floresta semidecídua, o domínio da Mata Atlântica (Veloso; Rangel; Lima, 1991). O solo foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico na Classificação Brasileira – com textura média de 25 a 40% de cascalho (Soil Survey Staff, 2014).

Inicialmente, a maior parte da área de mata nativa da fazenda foi convertida em pastagem extensiva de *Brachiaria decumbens* com baixa taxa de lotação do gado (por exemplo, uma unidade animal [UA] por hectare)), sem aporte de fertilizantes e sem correção da acidez do solo, levando a degradação gradual da terra. Em 2006, a Fazenda Capoava iniciou a implantação de projetos de recuperação da fertilidade do solo das pastagens e restauração ecológica florestal nas áreas degradadas. Várias dessas áreas com restauração em andamento foram avaliadas neste estudo. Seu histórico de uso da terra e descrição são apresentados abaixo e resumidos na Figura 1.

(i) Pastagem manejada desde 2006 (PA): calagem e adubação realizadas conforme recomendação de Raij et al. (1996). Em 2006 foi implantada uma nova pastagem com capim-bermuda Tifton-85 (*Cynodon* spp) para pastagem de cavalos na área degradada anterior. Nos cinco anos seguintes (2006 a 2011), a fertilidade do solo foi recuperada, a pastagem renovada e as formigas cortadeiras controladas. Desde 2006 até os dias de hoje, a pastagem tem sido bem manejada, com períodos de pastejo seguidos de descanso do pasto (pastejo rotativo) por equídeos (Figura Suplementar S1).

(ii) Restauração ativa (plantio escalonado) desde 2013 (R7): escalonamento do plantio em fases sequenciais conforme o método desenvolvido por Rodrigues et al. (2009) e Brancalion, Gandolfi e Rodrigues (2015). Essa área foi recuperada por meio de uma parceria de projeto entre a Fazenda Capoava e o Laboratório de Ecologia e Restauração Florestal (LERF-ESALQ-USP). Na primeira fase, de rápido crescimento, dez espécies arbóreas de vida curta foram plantadas para sombrear a área degradada anterior, reduzir a população de plantas daninhas (especialmente *Brachiaria* sp.) e criar rapidamente condições para o estabelecimento de outras espécies em regeneração. Além disso, nesta fase, foram plantadas fileiras de espécies de plantas fixadoras de N entre as fileiras de espécies arbóreas nativas para fornecer nutrientes e auxiliar no controle de plantas daninhas. Este “adubo de planta verde” envelheceu com o tempo. Então, na segunda fase, após um intervalo de 1,5 ano, um grupo funcional muito diversificado e rico de 80 espécies de árvores foi introduzido para aumentar a biodiversidade, restaurar a dinâmica ecológica da floresta e permitir o corte seletivo. Um total de 90 espécies foram alternadas e plantadas em uma densidade final de 1.666 árvores ha⁻¹ (Figura Suplementar S2).

(iii) Restauração ativa (plantio único) desde 2006 (R14): foram plantadas diversas espécies de árvores nativas de uma só vez. Essa área foi recuperada por meio de uma parceria de projeto entre a Fazenda Capoava e a Fundação SOS Mata Atlântica. Em 2006, os restantes pastos foram cortados deixando resíduos como cobertura do solo, e foram cavados buracos de 40 x 40 x 50 cm (largura, comprimento e profundidade) e preparados para a plantação de árvores. Em sequência, 110 espécies diferentes de árvores nativas da região foram plantadas na área degradada anterior. Mudanças de plantas de diferentes grupos ecológicos sucessionais (espécies pioneiras, secundárias e clímax) foram alternadas espacialmente ao acaso, totalizando 1666 árvores ha⁻¹. Também foi realizado o corte de ervas daninhas e a

replantação de árvores eventualmente mortas. Essas práticas de gestão foram realizadas apenas em 2006 e 2007 (dois anos). Nenhuma outra gestão foi realizada na área após isso (Figura Suplementar S3).

(iv) Floresta Primária (PF): Bioma da Mata Atlântica, uma floresta semidecídua sem sinais de perturbação antropogênica. Uma vez que esta área apresentava uma fase avançada de sucessão e ocorrência de espécies nativas chave (Zanini et al., 2021), foi utilizada como referência para o nosso estudo (Figura Suplementar S4).

Em relação às duas áreas de restauração, embora a metodologia fosse a mesma (ativa), o modelo adotado diferia. Ou seja, enquanto as árvores foram plantadas de uma só vez no R14, um modelo de restauração mais aperfeiçoado e estratégico foi utilizado na área mais jovem (R7), baseado em duas fases complementares de plantação de árvores, e utilizando adubo verde como fixador de nitrogênio. Nos primeiros quatro anos após a implementação, R7 foi supervisionado de perto pela LERF-ESALQ-USP. Figuras suplementares S1, S2, S3, e S4 fornecem imagens adicionais das áreas avaliadas.

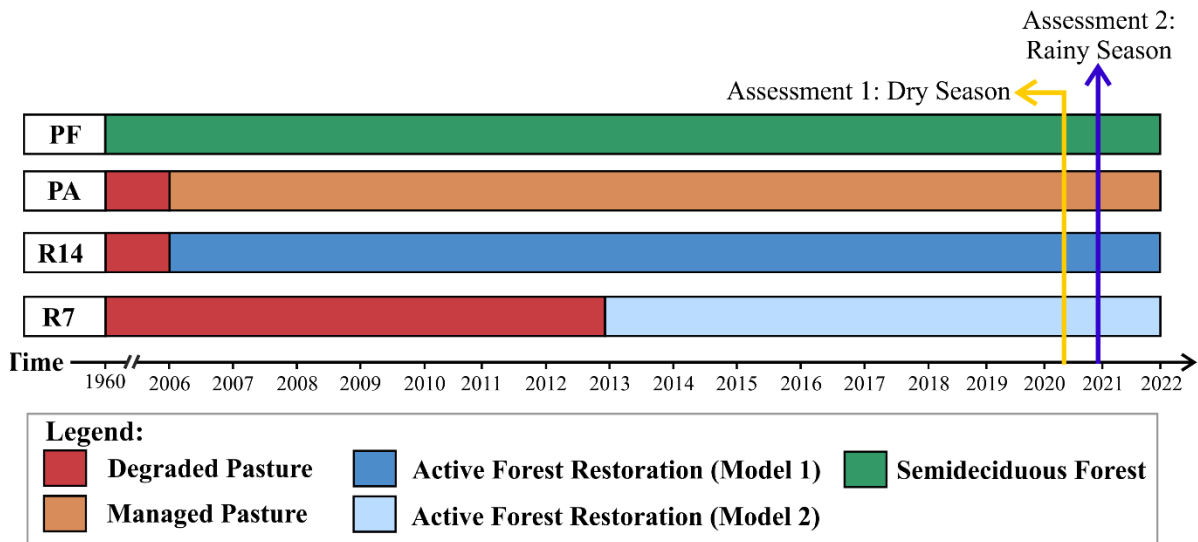


Figura 1. Histórico de uso do solo das áreas de estudo avaliadas. Modelo 1: plantação única. Modelo 2: plantio escalonado.

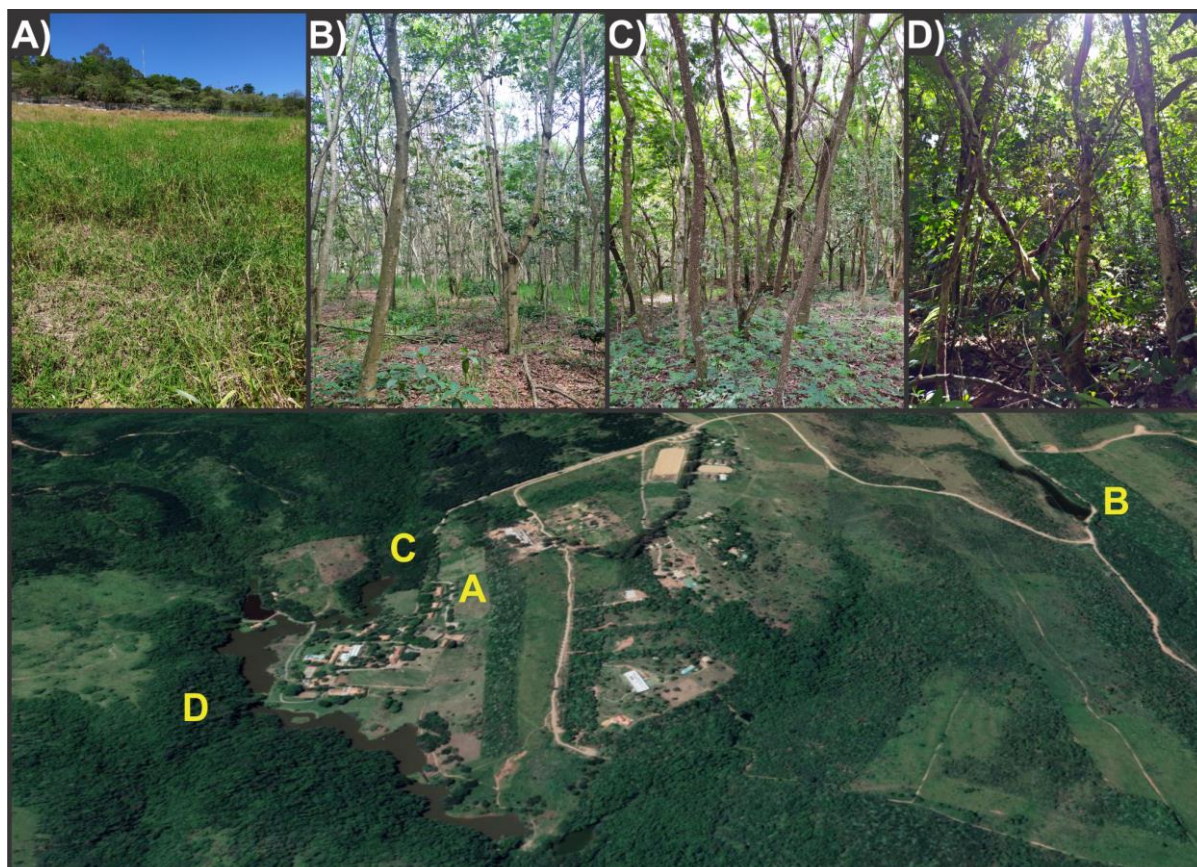


Figura 2. Pastagem (A), restauração ativa com plantio escalonado com sete anos de idade (B), restauração ativa com plantio único com quatorze anos de idade (C) e fragmento florestal semidecidual (D). Fotos: Wanderlei Bieluczyk. * A foto aérea foi tirada em abril de 2019 e obtida online através da visualização 3D do Google Maps.

2.2.2. Expedições de campo e amostragem de solo

A amostragem de solo foi realizada em duas expedições de campo em 2020: a primeira na estação seca (de 13 a 15 de maio), e a segunda na estação chuvosa (de 07 a 09 de dezembro). Cinco repetições ($n = 5$) em delineamento inteiramente casualizado da camada de 0-10 cm do solo foram amostradas para análises químicas, físicas e moleculares do solo. Cada repetição foi composta por 3 subamostras e estavam distantes 30 m uma da outra e das bordas do experimento. Amostras de solo para análises químicas e físicas foram transportadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LBCM - CENA/USP) e armazenadas em câmara fria a 7-8 °C. Amostras de solo para análise de DNA foram coletadas assepticamente e imediatamente colocadas em gelo para transporte e posteriormente armazenadas em freezer -80 °C até a extração de DNA.

2.2.3. Análise química e física de amostras do solo

As análises físicas foram realizadas no Laboratório de Física do Solo do CENA-USP e as análises químicas no Laboratório Agrotécnico de Piracicaba (PIRASOLO). Os atributos físicos do solo foram determinados de acordo com Teixeira et al. (2017) e compreendeu densidade (D_s), porosidade total, macroporosidade e microporosidade do solo - medidos em cilindros não perturbados de 5 x 5 cm. Os parâmetros químicos do solo foram medidos por métodos analíticos descritos em Donagema et al. (2011). O pH do solo foi medido em 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂; cátions trocáveis (cálcio [Ca], magnésio [Mg] e potássio [K]), bem como fósforo disponível (P), foram extraídos em uma resina de troca iônica, então medidos por AAS, fotometria de chama e colorimetria, respectivamente. As concentrações de cátions ácidos trocáveis (alumínio (Al) e acidez potencial (H+Al)) foram determinadas por titulação (solução padrão: 0,025 mol L⁻¹ NaOH) na extração tratada com 1 mol L⁻¹ and 0,5 mol L⁻¹ de KCl e acetato de cálcio (pH 7,0), respectivamente. A digestão com bicromato de sódio foi utilizada para quantificar o teor de matéria orgânica (MOS) e carbono do solo. O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl, já o amônio (NH₄⁺) foi determinado por condutimetria. O boro (Bo) foi extraído em água quente determinado por espectrofotometria com azometina-H a 420 nm. Cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) foram extraídos pelo extrator DTPA-TEA (pH 7,3) e determinados por espectrometria de absorção atômica. Os resultados também permitiram o cálculo de outros parâmetros: soma de bases (SB) pela soma de Ca, Mg e K; capacidade de troca catiônica (CTC) pela soma de SB, Al e H; saturação por bases (V%), relação percentual entre SB e CTC; e saturação de Al (m%), a relação percentual entre Al trocável e CTC.

2.2.4. Extração de DNA de amostras do solo

O DNA do solo de cada amostra foi extraído em duplicata e as extrações foram realizadas pesando 0,25 g de solo, utilizando o PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, German), e seguindo o protocolo de extração otimizado para solos tropicais (Venturini et al., 2020). A quantidade e a qualidade do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1% e em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) para determinar a absorbância nos seguintes comprimentos de onda: 230, 260, 280 e 320 nm. Após isso, o DNA foi armazenado a -20°C até ser processado.

2.2.5. PCR quantitativo em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) das amostras de DNA foi usada para quantificar os grupos de interesse descritos na Tabela 1. Os genes alvo foram obtidos por PCR a partir de cepas padrão fornecidas pela DSMZ (do inglês Deutsch Collection of Microorganism and Cell Cultures) ou a partir da amplificação e purificação do gene em DNA ambiental. Então, para cada gene, uma curva padrão foi construída usando entre 10^1 e 10^{10} cópias. A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra em StepOne Plus (Applied Biosystems). O volume final de cada tubo foi de 10 μ L, contendo 5 μ L de SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de cada primer (5 pmols), 1 μ L de DNA e 2 μ L de água ultrapura estéril (Milli-Q), e os ciclos de reação seguiram os protocolos estabelecidos previamente.

Tabela 1. Primers utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA de Bacteria e Archaea, *nifH*, *nirK* e *nosZ*.

Gene	Grupo alvo	Primers	Sequência (5' - 3')	Tamanho fragmento (pb)	Referência
16S rRNA Bacteria	Comunidade total de bactéria	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	136	Caporaso et al. (2011)
		806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
16S rRNA Archaea	Comunidade total de archaea	519F	CAGCCGCCGCGGTAA	397	Klindworth et al. (2012) Stahl; Amman (1991)
		915R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT		
<i>nifH</i>	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	17167F	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	432	Wallenstein; Vilgalys (2005)
		17167R	TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT		
<i>nosZ</i>	Genes de óxido nitroso redutase	NosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST	267	Henry et al. (2006)
		NosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA		
<i>nirK</i>	Genes de nitrito redutase	876F	ATYGGCGGVCAYGGCGA	520	Henry et al. (2004)
		1040R	GCCTCGATCAGRTRTRTGTT		

2.2.6. Sequenciamento do gene 16S rRNA arqueal e bacteriano

A diversidade das comunidades microbianas foi avaliada por sequenciamento em larga escala para a amplificação da região V4 do gene 16S rRNA (Bacteria/Archaea), usando o seguinte conjunto de primers: 515F/806R (Apprill et al., 2015; Parad; Needham; Fuhrman, 2016), com a seguinte sequência (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACNVGGGTWTCTAAT). O sequenciamento em pares, com leituras de 2 x 250 bp, foi realizado na plataforma NovaSeq 6000 PE250 da Novogene Bioinformatics Technology, usando o protocolo padrão da empresa. A partir desses dados, foi possível estimar a riqueza, diversidade e perfis taxonômicos das comunidades de Bacteria e Archaea nos solos.

2.2.7. Análise de dados

As análises de bioinformática foram realizadas no software R Studio 3.5.1 (R Studio Team, 2018). As sequências brutas obtidas foram analisadas a partir da abordagem de Variantes da Sequência do Amplicon (do inglês ASVs, *amplicon sequence variants*) usando o pacote Dada2 1.9.3 (Callahan et al., 2016). As sequências obtidas foram filtradas considerando o controle de qualidade *Phred score* > 30. Em seguida, foram corrigidas em relação aos erros de sequenciamento, derreplicadas, unidas (*paired-end merge*) e as quimeras foram removidas. A taxonomia foi atribuída usando o banco de dados SILVA versão 138.1 (27/08/2020). Objetivando normalizar o número de sequências, foi realizada a rarefação para 83.000 sequências por amostra a partir do pacote phyloseq 1.34.0. A predição funcional a partir das sequências de 16S rRNA foi realizada a partir do software Picrust2 (versão e referência) e os genes funcionais relacionados ao ciclo do N foram manualmente filtrados com base em Tu et al. (2019).

As análises estatísticas e visualização gráfica foram realizadas usando os pacotes vegan 2.5-1 (Oksanen et al., 2018), ARTool 0.10.5 (Kay; Wobbrock, 2018), lsmmeans 2.30-0 (Lenth, 2018), dunn.test 1.3.5 (Dinno, 2017) and ggplot2 3.1.0 (Wickham; Chang, 2016). Primeiramente, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade de Levene foi realizado para definir o teste estatístico mais adequado a ser utilizado para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. A análise de variância (ANOVA) de dois fatores com dados ranqueados foi usada para investigar o efeito da localização e tempo de amostragem na composição química do solo, na abundância relativa dos genes relacionados ao ciclo do N preditos e a

quantificação dos genes taxonômicos e funcionais, o último seguido por comparações aos pares usando o ajuste de Tukey ($p < 0.05$). Já para os dados físicos, foi realizada a comparação somente entre as áreas. Adicionalmente, avaliamos a estrutura da comunidade microbiana e sua correlação com parâmetros ambientais utilizando a análise de redundância (RDA), utilizando o software Canoco 5 (Biometrics, Wageningen, Holanda).

Também avaliamos a ocupação de nicho, ou seja, a porcentagem de grupos microbianos generalistas e especialistas em cada tratamento, por meio do método de classificação multinomial de espécies usando o pacote 'vegan' e a função 'clamtest' no software R. Por fim, análises de rede (network) foram realizadas para avaliar a complexidade das interações entre os táxons microbianos em cada tratamento. Para isso, foi realizada a análise de co-ocorrência não aleatória usando o módulo em Python 'SparCC' (Friedman; Alm, 2012). Para cada rede, as correlações foram calculadas e apenas as mais fortes ($r > 0,9$ ou $r < -0,9$) e significativas ($p < 0,05$) foram selecionadas. Os nós na rede representam ASVs, enquanto as linhas que os conectam representam correlações significativamente positivas ou negativas entre os nós. Os grafos da rede foram baseados em um conjunto de medidas, incluindo o número de nós, número de arestas, modularidade, número de comunidades, conectividade média dos nós, comprimento médio do caminho, diâmetro e distribuição cumulativa de graus. A visualização das redes e as medidas das propriedades foram calculadas com a plataforma interativa Gephi (Bastian; Heymann; Jacomy, 2009).

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Caracterização física e química das amostras de solo

Os resultados das análises estatísticas revelaram diferenças na composição química entre as quatro áreas do presente estudo, como pode ser observado nas Tabelas Suplementares S2 e S3. Todos os atributos químicos, tanto macro, quanto micronutrientes, com exceção do enxofre e boro, resultaram em diferenças estatísticas entre as áreas ($p < 0,05$).

Além disso, em relação a saturação por bases, apenas a R7 se enquadrou em solos distróficos (pouco férteis), com $V\% < 50$. Em geral, o potencial hidrogeniônico (pH) dos solos florestais ficou abaixo de 5,5, sendo mais baixo na R14, também a média da matéria orgânica foi menor para as áreas restauradas do que para a floresta e o pasto em ambas as épocas, com menor média na área R14. Já para a análise

física, entre os atributos estudados, a densidade do solo, a porosidade total e a macroporosidade, apresentaram diferenças estatísticas entre as áreas de estudo, com exceção da microporosidade, como pode ser observado na Tabela Suplementar S5.

A saturação por bases é um excelente indicativo das condições gerais de fertilidade do solo, com a qual podemos classificar os solos em eutróficos, considerados férteis ($V\% \geq 50\%$), e distróficos, não muito férteis ($V\% < 50\%$), como foi o caso da área R7 (Ronquim, 2010). Essa classificação também é utilizada como complemento na nomenclatura dos solos. Porém, a fertilidade do solo é extremamente complexa em solos sob condições tropicais, pois as plantas podem ser adaptadas às condições nutricionais dos locais onde crescem, respondendo a mudanças mais curtas na disponibilidade de nutrientes de forma diferente devido às variadas condições do solo (Ostertag, 2001).

Em relação aos valores de pH, quanto maior, mais relacionado à maior disponibilidade de matéria orgânica (Moreira et al., 2021), o que confirma o resultado da área R14, a qual apresentou menor pH e menor média de matéria orgânica se comparada às demais áreas, ambos com diferença significativa (Suplementares S2 e S3). No caso da matéria orgânica, as áreas de restauração apresentaram menor média do que a floresta e a pastagem, este resultado pode ser usado como um indicador de possíveis alterações no solo, já que o teor de MOS é menor em condições estressantes (Rocha et al., 2015).

O solo da R14, foi classificado de acordo com Santos et al. (2018) como fortemente ácido, já a R7, pastagem e floresta foram classificados como moderadamente ácidos, sendo que o pasto alcançou a neutralidade em época seca, porém sem diferenças estatísticas entre as épocas.

Com relação a caracterização das propriedades físicas do solo, encontramos valores médios da densidade do solo, nessa ordem: floresta < R14 < R7 < pastagem (Tabela Suplementar S4) e com diferença significativa entre áreas ($p < 0,05$, Tabela Suplementar S5), sendo que esses valores encontrados se encaixam no padrão, normalmente variando de $0,90 \text{ g/cm}^3$ a $1,5 \text{ g/cm}^3$ dependendo da estrutura do solo. Mas, pode se dizer que os solos apresentam valores de Ds maiores devido à processos de compactação e menor devido a incorporação de matéria orgânica e práticas de preparo do solo (Lepsch, 2011). Resultado semelhante foi observado por Bertacchi et al. (2012), em que a maior densidade também foi encontrada na restauração mais recente.

Por outro lado, solos menos densos se tornam mais porosos. Os poros são formados por ações físicas e biológicas, importantes por reterem água, permitindo a drenagem; entrada de oxigênio (O_2); remoção de dióxido de carbono (CO_2) do solo e penetração das raízes (Ker et al., 2012). Conforme Tabela Suplementar S4, na qual as médias da porosidade total se apresentaram tais como: pastagem < R7 < R14 < floresta, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$, Tabela Suplementar S5).

2.3.2. Estrutura, diversidade e riqueza da comunidade microbiana

Aproximadamente 5.500.000 de sequências brutas foram geradas a partir de 40 amostras usando sequenciamento de amplicon de 16S rRNA. Porém, após o controle de qualidade, foram obtidas aproximadamente 4.000.000 de sequências com comprimento médio de 269 pb.

Para avaliar a estrutura taxonômica da microbiota e relacioná-la com as propriedades químicas do solo, foi utilizada a análise de redundância (RDA). A partir da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), identificamos um baixo efeito, apesar de significativo, dos fatores área e estação na estruturação da comunidade microbiana. Neste sentido, a mudança de uso do solo tende a ser o fator preponderante para a modulação da microbiota dessas áreas ($R^2 = 0.259$). Com destaque para a área R7 que se diferenciou das demais, provavelmente por ter sofrido intervenções mais recentes que as demais áreas e a área R14, a qual foi intermediária, apresentando uma tendência ao retorno para um estágio semelhante ao de referência, próximo do pasto (mesma idade de restauro) e a floresta nativa (Figura 3).

Em geral, as áreas de pasto, R14 e floresta primária apresentaram o maior número de correlações com propriedades químicas do solo. Já na R7, ferro (Fe) e cobre (Cu) foram as propriedades do solo que se correlacionaram com o maior número de grupos microbianos da área (Figura 3).

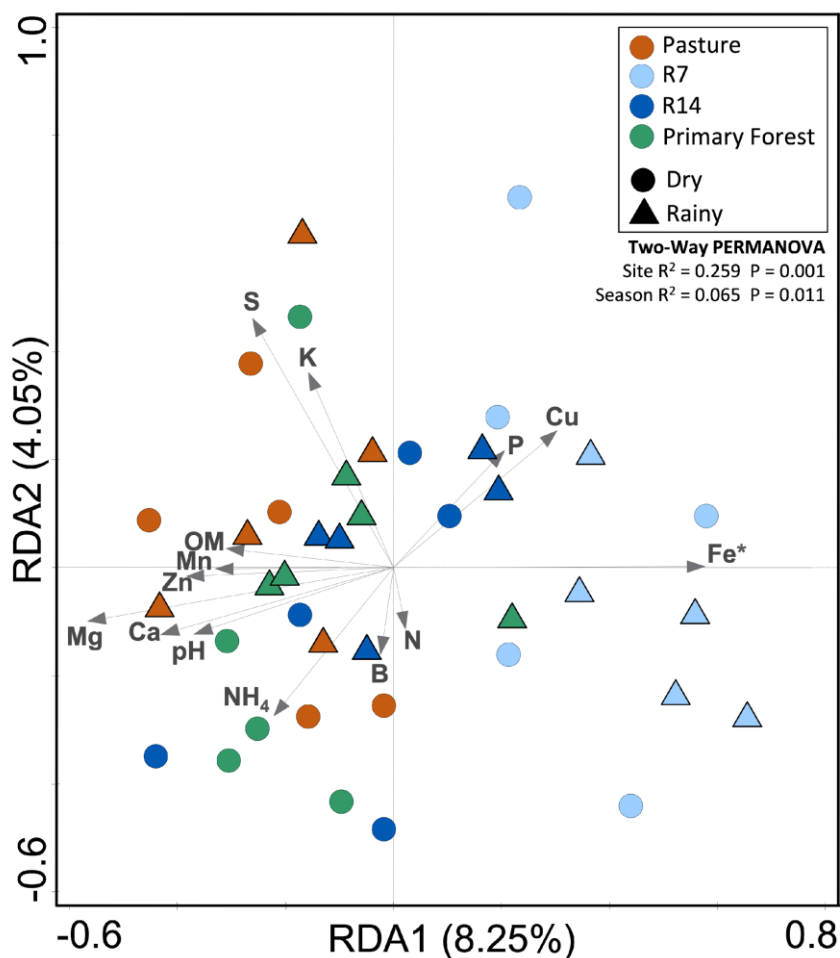


Figura 3. Análise de redundância (RDA) dos padrões da comunidade microbiana e propriedades químicas do solo de amostras na camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e uma única plantação com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca. Análise taxonômica de Bacteria e Archaea usando abundância relativa baseada no gene 16S rRNA em nível de gênero. As setas indicam a correlação entre as propriedades químicas do solo e o perfil taxonômico microbiano.

A análise da Figura 3 revela um agrupamento entre as amostras dos solos R14, pastagem e floresta e uma segregação do solo de R7 em relação aos demais ambientes, esse fato pode ser relacionado ao tempo limitado que essa área (R7) teve para recuperação de seus atributos se comparada às áreas mais antigas (Bertacchi et al., 2012).

Também, o Fe foi a propriedade química do solo que mais se correlacionou com a comunidade microbiana da área R7. Esse micronutriente é essencial para a manutenção da vida e é pouco disponível na maioria dos solos. Em plantas, está associada a diversos processos importantes, dentre eles, com a fixação de N_2 (Alexandre et al., 2012).

No caso do amônio (NH_4^+), forma de N assimilada pelas plantas, tivemos uma maior correlação com o fragmento florestal, seguindo o padrão geral de evolução da ciclagem de N em florestas tropicais: onde há maior disponibilidade de serapilheira, maior conteúdo de N, conforme o desenvolvimento da sucessão no processo de restauração, já que a produção de serapilheira tende a ser maior em florestas maduras (Silva et al., 2018).

Apesar da estrutura da microbiota não ser tão diferente entre as áreas, é possível observar que as quatro áreas apresentaram padrões distintos de riqueza e diversidade, conforme Figura 4. No solo de pastagem, obtivemos maior riqueza de gêneros microbianos em comparação à solos florestais em época seca, já na época chuvosa, apenas a R7 se diferenciou nitidamente das demais, tendendo a uma menor riqueza (Figura 4), com diferença significativa entre as áreas x estações ($p < 0.05$) (Tabela 3), mostrando que não somente o uso do solo ou a estação influenciam de forma isolada, mas também a interação entre ambos.

Independentemente da época de amostragem, as amostras das áreas de pasto e R14 apresentaram maior riqueza e diversidade de ASVs em relação às amostras de solo da R7 e fragmento nativo, com diferença significativa entre as áreas ($p < 0.05$) (Tabela 3).

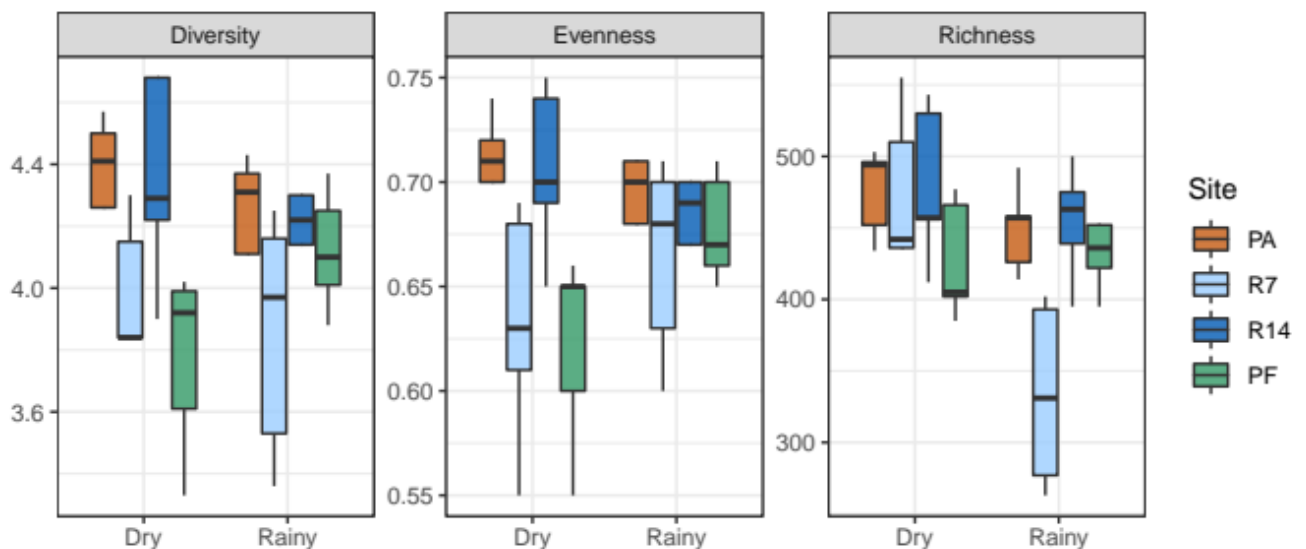


Figura 4. Medidas de Diversidade (Shannon), Equitatividade (Pielou) e Riqueza (ASVs observadas) obtidas a partir das sequências de 16S rRNA.

Tabela 2: Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) das medidas de Diversidade na camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Medidas de diversidade</i>									
Diversidade (Índice Shannon)	3	4,103	0,014	1	0,002	0,961	3	1,184	0,331
Riqueza (Observada)	3	3,869	0,018	1	11,424	0,002	3	3,312	0,032
Equidade (Índice de Pielou)	3	3,504	0,026	1	0,447	0,509	3	1,719	0,183

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

Os índices de diversidade levam em conta a riqueza de espécies e abundância de indivíduos, caracterizando a estrutura da comunidade. Já a riqueza é usada para determinar o número total de membros da comunidade (Little et al., 2008).

A diversidade microbiana pode ter um importante papel na manutenção da qualidade dos solos e seus estudos são essenciais para o descobrimento de indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes ou a utilização não sustentável de solos agrícolas, já que se organizam de forma diferentes em resposta a variados tipos de distúrbios (Lambais et al., 2005).

Com base nisso, notamos que o pasto apresentou uma maior diversidade de espécies e número de membros se comparado com os solos florestais (Figura 4), dado também apresentado por Mendes et al. (2015), no qual, sugerem que ecossistemas em equilíbrio, como solos de floresta, são mantidos por uma menor diversidade de microrganismos, já que essa diversidade se mostra importante para a manutenção do funcionamento do solo após um evento de estresse, juntamente com maior riqueza.

2.3.3. Abundância total e relativa das comunidades microbiana

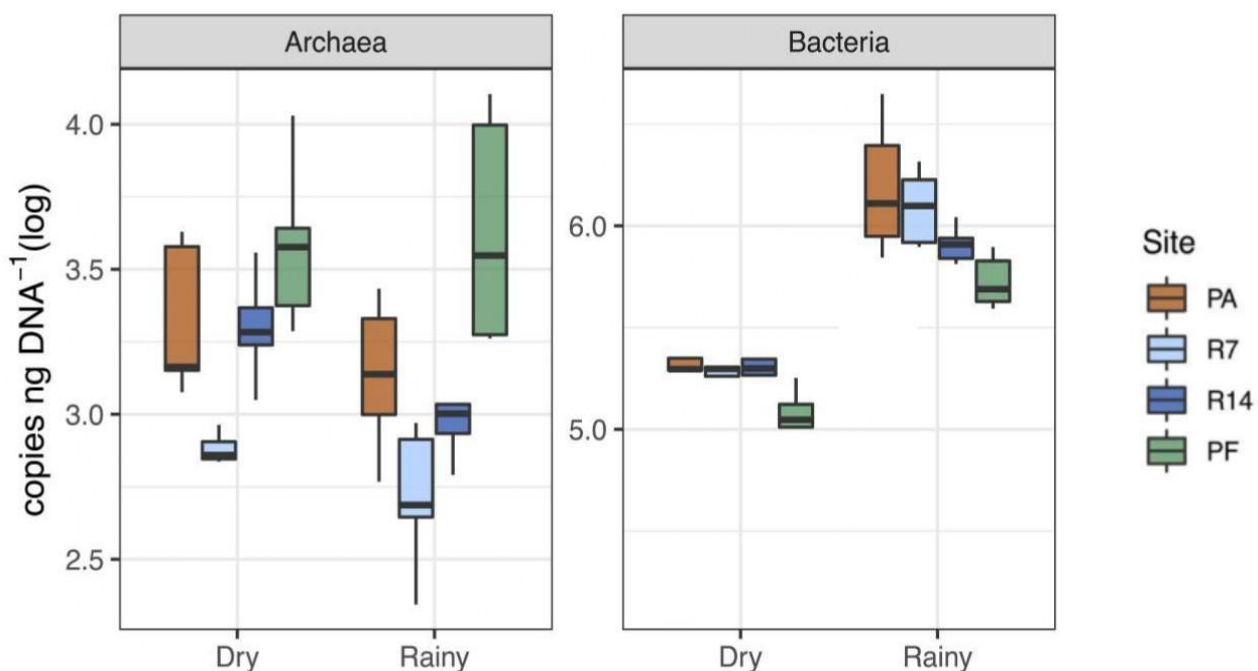
A técnica de PCR quantitativa foi usada para avaliar as alterações na abundância total de Bacteria e Archaea representadas pelos genes 16S rRNA, entre diferentes paisagens. As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR desses genes apresentaram excelentes coeficientes de correlação, acima de $r^2=0,99$

e eficiência entre 90 e 95%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados na Figura 5A.

No geral, a abundância de Archaea foi maior na floresta primária em ambas as estações e com menor abundância na R7, quando comparada às demais áreas, apresentando diferença estatística entre os usos do solo (Tabela 4). Já na comunidade bacteriana, tivemos uma notável diferença na abundância total entre época seca e chuvosa ($F=110.765$ e $p<0,05$, Tabela 4) e também entre as áreas ($p<0,05$), notados na Figura 5A, na qual a comunidade de bactérias diminui de acordo com a cronossequência, sendo pasto maior que a floresta.

Além disso, o sequenciamento do gene 16S rRNA Bacteria e Archaea revelou que as quatro áreas de estudo tendem a apresentar perfis taxonômicos semelhantes em ambas as estações avaliadas, com predominância dos filos bacterianos Acidobacteria (variando de 10,94 a 12,16%), Actinobacteria (21,78 - 27,39%), Chloroflexi (2,69 - 3,72%), Firmicutes (3,08 - 8,51%), Nitrospirae (0,14 - 0,30%), Planctomycetes (3,16 - 3,56%), Proteobacteria (27,81 - 39,9%) e Verrucomicrobia (6,46 - 12,89%), e Crenarchaeota (0,29 - 3,3%) do domínio Archaea (Figura 5B).

A)



B)

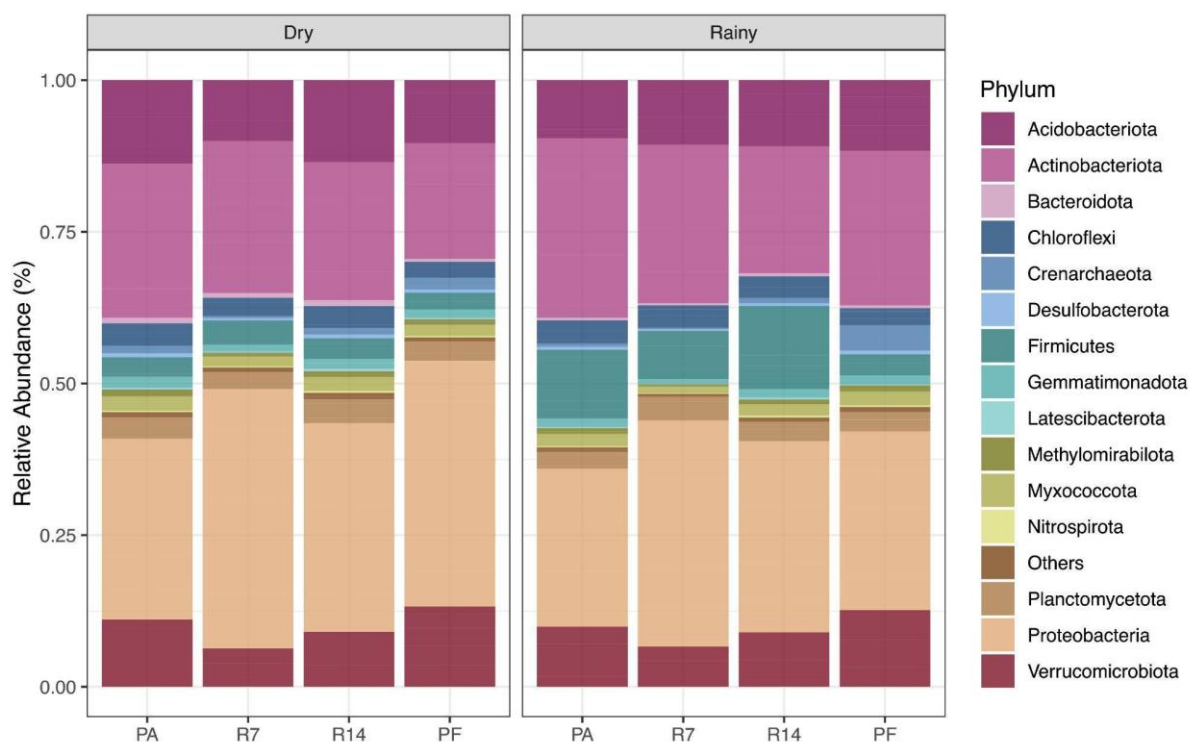


Figura 5: (a) Número de cópias dos genes 16S rRNA de Archaea e Bacteria (ng/DNA) (b) e perfil taxonômico das comunidades microbianas a nível de filo (com base no gene 16S rRNA) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Tabela 3. Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) de dados de quantificação de genes 16S rRNA de Archaea e Bacteria (copies ngDNA-1) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e uma plantação única com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Quantificação de genes (cópias ng DNA-1)</i>									
16S rRNA Archaea	3	20,512	<0,001	1	2,327	0,137	3	0,809	0,498
16S rRNA Bacteria	3	7,281	<0,001	1	110,765	<0,001	3	1,009	0,401

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

A variação no gene 16S rRNA bacteriano foi clara entre as épocas avaliadas, apresentando padrões diferentes, com um aumento em época chuvosa (Figura 5a), indicando que a mudança de estação influenciou a abundância de bactérias nas amostras analisadas ($p < 0,05$, Tabela 3). Tal resultado corrobora com o estudo de Rodrigues et al. (2011), atentando para o papel fundamental da pluviosidade no crescimento da população bacteriana no solo, provavelmente por gerar um microambiente favorável a esses microrganismos. Já as archaeas não apresentaram diferenças significativas em razão dos diferentes períodos sazonais.

O sistema de uso da terra também influenciou ($p < 0,05$, Tabela 3), com valores maiores para o pasto nas duas épocas amostradas e menores para a floresta semidecídua, também nas duas épocas amostradas.

Archaeas foram menos abundantes do que bactérias em todos os sistemas analisados. Os maiores números de cópias do gene 16S rRNA de archaea foram detectados na floresta, porém a relação de comunidades de archaeas do solo com diferentes parâmetros é pouco esclarecida, sugerindo que alterações nessas comunidades estão mais relacionadas a competição por recursos com outros domínios microbianos (Siles et al., 2017).

Um fato interessante para destacar na Figura 5 com relação aos perfis taxonômicos, é que foram obtidos mais filós ligados à função de fixação de nitrogênio, como por exemplo, os grupos Proteobacteria e o Actinobacteria, uns dos principais grupos de diazotróficos (Hallin et al., 2018).

2.3.4. Ocupação de nicho

A análise de ocupação de nicho foi utilizada para comparar a abundância da comunidade microbiana entre dois ambientes, na qual classifica os microrganismos em diferentes classes (generalistas, especialistas e raros).

Observando a Figura 6, podemos notar que quando comparada a área de pastagem com as áreas de floresta (R7, R14 e PF), tanto nativa quanto restaurada, os grupos microbianos classificados como especialistas foram maiores no pasto, com 16,8%, 4,4% e 10,8% respectivamente, mostrando uma tendência de que quando convertida de pasto para floresta, a presença de especialistas diminui.

A comparação do pasto com a restauração de 14 anos apresentou o maior número de generalistas 49,6%, mutuamente presentes em ambos os locais, do que as demais áreas florestais, com uma menor diferença entre a porcentagem de

especialistas. Já, quando comparadas apenas às florestas, a floresta nativa apresentou uma porcentagem de especialistas menor do que ambas as restaurações e uma porcentagem similar de generalistas.

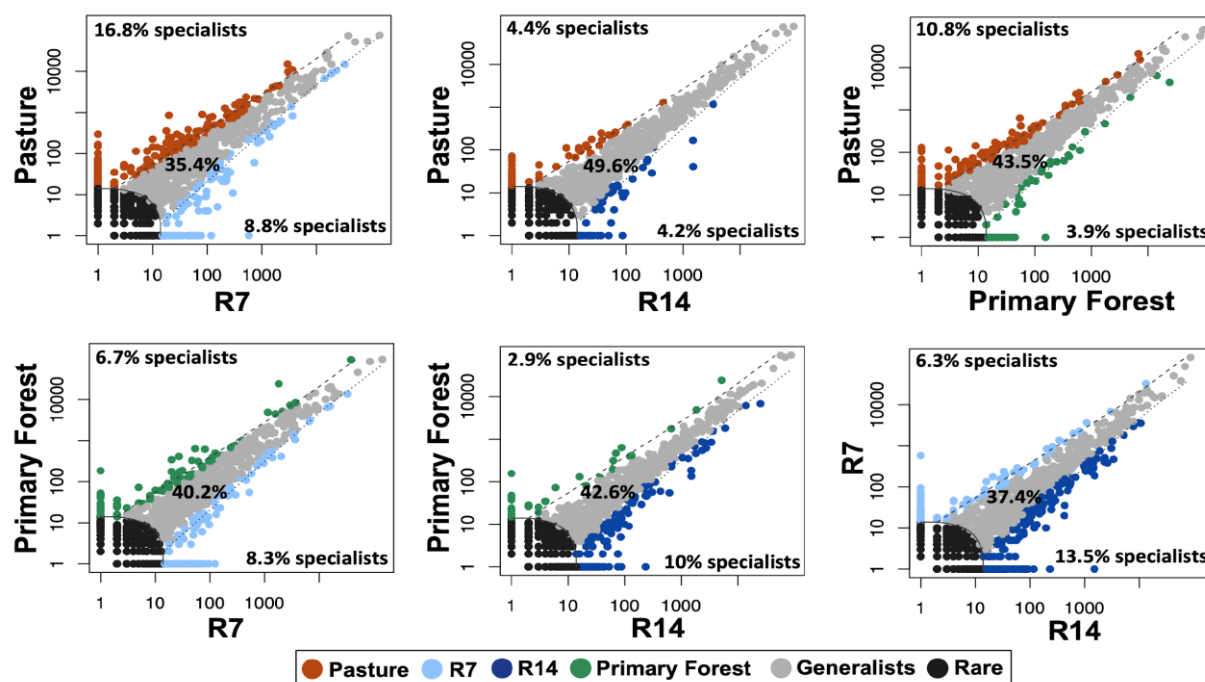


Figura 6. Análise de especialização do habitat microbiano em diferentes sistemas de uso da terra. A classificação de generalistas e especialistas foi realizada por meio do método Multinomial de classificação de espécies (CLAM) no pacote Vegan no programa R, de acordo com a abundância relativa estimada das espécies. Os eixos x e y representam o turnover de abundância de ASVs entre as regiões. Os generalistas (cinza), especialistas (laranja, azul claro e azul) e raros (preto) são indicados com seus respectivos percentuais.

A ocupação de nicho entende-se pela porcentagem de generalistas e especialistas nos diferentes usos do solo, sempre comparados dois a dois. Pode-se verificar a abundância da comunidade microbiana entre as áreas, classificando os microrganismos em três classes: generalistas (um grupo que é similarmente partilhado entre as duas áreas), especialistas (restritos a certos habitats, mas localmente abundantes) e muito raros para classificar (Chazdon et al., 2011).

Diferentes espécies de microrganismos podem ser favorecidas em alguns habitats e desfavorecidas em outros. No caso de espécies generalistas, essas são favorecidas por habitat já estabelecidos e estáveis, uma vez que o ambiente deve parecer relativamente mais homogêneo do que para espécies especialistas, as quais são altamente responsivas a distúrbios ambientais (Kneitel; Chase 2004; Pandit;

Kolasa; Cottenie, 2009), o que pode ser observado na menor porcentagem de especialistas no fragmento florestal se comparado com as demais áreas, já que há uma tendência a estabilidade.

2.3.5. Análise de rede de co-ocorrência

A análise de rede de co-ocorrência foi utilizada para representar a associação entre as comunidades microbianas e identificar alterações nas relações potenciais com os usos do solo. Podemos observar alterações na composição da rede em cada área (Fig. 7), em geral, a complexidade dos parâmetros da rede, incluindo nós, correlações, grau médio, mostrou que as redes das áreas restauradas R7 (número de nós = 456, bordas = 4728, grau médio ou conectividade de nó = 20,73) e R14 (número de nós = 455, bordas = 4485, grau médio ou conectividade de nó = 16,16) apresentaram maior complexidade do que a floresta primária (número de nós = 482, bordas = 2773, grau médio ou conectividade de nó = 11,50) e o pasto (número de nós = 544, bordas = 3018, grau médio ou conectividade de nó = 11,09). A rede do fragmento florestal preservado foi a menos complexa, embora um número relativamente grande de interações ainda foi observado, pois um solo florestal é um ambiente bastante dinâmico.

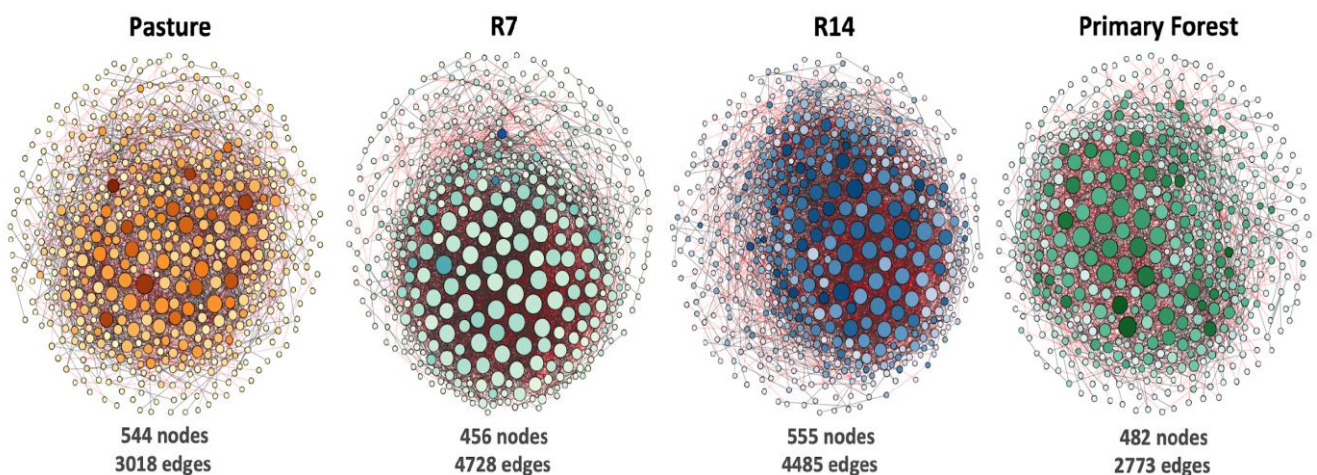


Figura 7: Análise de coocorrência de rede de comunidades microbianas de amostras de solo em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta semidecídua primária (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14). Uma conexão significa correlação de Spearman com magnitude $> 0,7$ (correlação positiva – bordas cinzas) ou magnitude $< -0,7$ (correlação negativa – bordas vermelhas) e estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$). Cada nó representa mesmos táxons em nível de gênero e o tamanho do nó é proporcional ao número de conexões (ou seja, grau).

Tabela 4. Propriedades topológicas de redes microbianas em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta semidecídua primária (PF), pastagem (PA) e restauração ativa utilizando plantio escalonado com sete anos (R7) e plantio único com quatorze anos (R14).

Propriedades da rede	Pasto	R7	R14	Floresta Primária
Número de nós ^a	544	456	555	482
Número de arestas ^b	3018	4728	4485	2773
Bordas positivas ^c	1780 (59%)	3156 (67%)	2589 (58%)	1612 (58%)
Bordas negativas ^d	1238 (41%)	1572 (33%)	1896 (42%)	1161 (42%)
Modularidade ^e	2,257	0,888	2,668	2,617
Número de comunidades ^f	85	71	90	88
Diâmetro da rede ^g	8	9	10	8
Comprimento médio do caminho ^h	3,505	3,381	3,475	3,534
Grau médio ⁱ	11,09	20,73	16,16	11,50
Coefficiente de agrupamento médio ^j	0,313	0,426	0,374	0,347

^aTáxon microbiano (em nível de gênero) com pelo menos uma correlação significativa ($P < 0,05$) e forte (Spearman $> 0,7$ ou $< -0,7$);

^bNúmero de conexões/correlações obtidas pela análise de Spearman;

^cCorrelação positiva ($> 0,7$ com $P < 0,05$);

^dCorrelação negativa ($< -0,7$ com $P < 0,05$);

^eA capacidade dos nós de formar comunidades altamente conectadas, ou seja, uma estrutura com alta densidade de conexões entre nós (inferidas pelo Gephi);

^fUma comunidade é definida como um grupo de nós densamente conectados internamente (Gephi);

^gA maior distância entre os nós da rede, medida em número de arestas (Gephi);

^hDistância média da rede entre todos os pares de nós ou o comprimento médio de todas as arestas da rede (Gephi);

ⁱO número médio de conexões por nó na rede, ou seja, a conectividade do nó (Gephi);

^jComo os nós são incorporados em sua vizinhança e o grau em que eles tendem a se agrupar (Gephi).

As redes representam interações biológicas, como por exemplo, a competição e o mutualismo (Zhou et al., 2011). Nelas, as comunidades interagem de forma que podem afetar tanto seu crescimento quanto seu metabolismo, resultando em padrões de abundância de espécies ou até mesmo o contrário, onde, um par microbiano coocorrendo, indica que há respostas semelhantes a fatores ambientais (Khan et al., 2019).

Essa diferença vista nas redes das restaurações se comparadas às outras áreas pode ser explicada pelo fato de as estruturas das comunidades microbianas serem altamente influenciadas por fatores biológicos, químicos e físicos em constante mudança (Bascompte, 2007), já que passaram por mudanças do uso do solo mais recentemente, quando convertidas de pastagem para floresta, sofrendo possíveis distúrbios.

2.3.6. Genes associados ao ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para todos os organismos vivos, porém, em sua maioria, está acessível na forma de gás dinitrogênio atmosférico (N_2), utilizado apenas por bactérias e archaea fixadoras de nitrogênio, as quais alteram o estado de oxidação do nitrogênio de N_2 para amônia (NH_3) - forma de N orgânico - processo conhecido como fixação de N, considerado a primeira etapa deste ciclo biogeoquímico para entrada de N no solo (Kuypers; Marchant; Kartal, 2018).

Após isso, para que o N se torne biodisponível aos demais organismos é necessária que ocorra a mineralização do N orgânico liberado, na qual o NH_3 é transformado em amônio (NH_4^+), realizado por uma ampla diversidade de microrganismos e através da decomposição da matéria orgânica proveniente da vegetação, tornando-se N inorgânico (Crews; Peoples, 2005; Dias, 2016).

Na última etapa do ciclo está o processo conhecido como desnitrificação, no qual os compostos de nitrogênio são convertidos em N_2 e devolvidos à atmosfera (Ligi et al., 2014).

Utilizamos a abundância relativa com base na predição funcional do gene 16S rRNA de modo a relacionar funções e interações das comunidades microbianas com processos ambientais ligados ao ciclo do nitrogênio. Na Figura 8, nota-se, uma maior porcentagem de microrganismos ligados a fixação de N na área R7 do que nas demais áreas, observando uma diferença significativa entre as áreas ($p < 0,05$, Tabela 6) e sem diferenças significativas entre as estações para esta etapa do ciclo.

Já em relação a desnitrificação, a porcentagem do pasto está visivelmente abaixo das demais áreas (Figura 8), porém não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre áreas e nem entre estações (Tabela 6). Observamos uma tendência a uma maior quantidade de genes ligados a esta etapa do ciclo do N na área de R7 e Floresta, sendo que esse padrão se repete para ambas as estações.

Já em relação ao metabolismo do nitrogênio, tivemos uma diferença significativa entre as estações do ano ($p < 0,05$, Tabela 6), com maior abundância relativa na época seca para todas as quatro áreas (Figura 8).

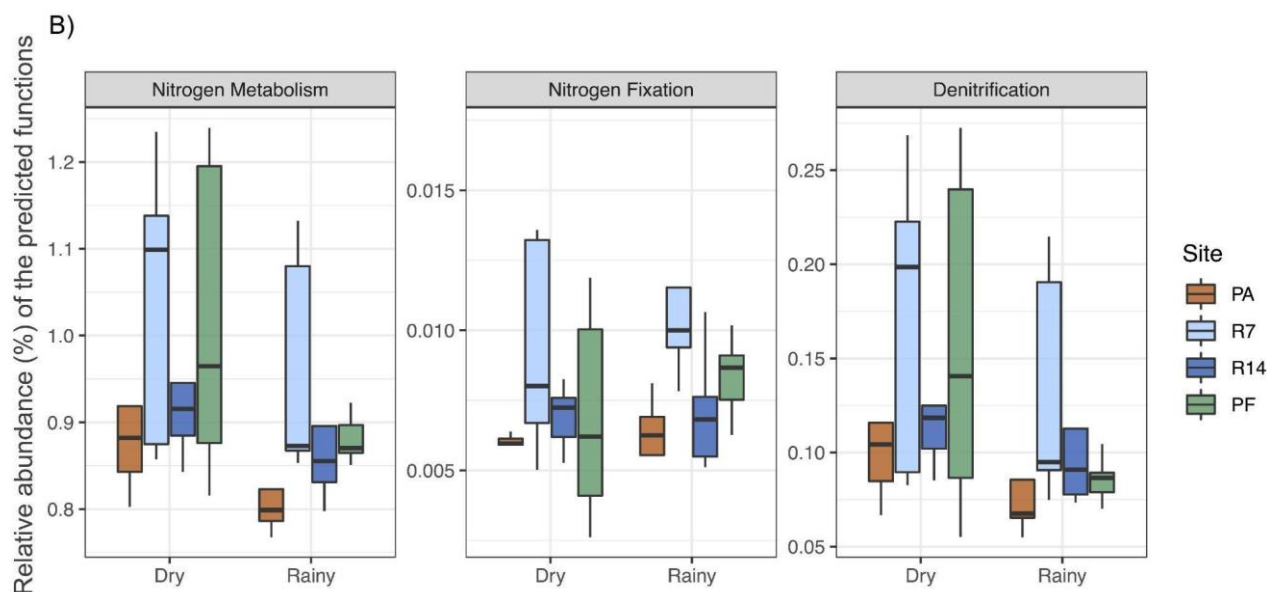


Figura 8. Abundância relativa com base na predição funcional do gene 16S rRNA relacionados ao ciclo do nitrogênio (usando o software Picrust2).

Tabela 5: Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) de dados de predição funcional (abundância relativa) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Predição funcional (abundância relativa)</i>									
Metabolismo do nitrogênio	3	1,712	0,184	1	3,333	0,077	3	0,119	0,948
Fixação de nitrogênio	3	4,758	0,007	1	1,398	0,236	3	0,380	0,768
Desnitrificação	3	0,959	0,424	1	2,834	0,102	3	0,264	0,851

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

A diferença apresentada pela área R7 em relação a fixação de N provavelmente é reflexo da adubação verde aplicada no início da restauração desta área. Esse método faz com que, entre outras qualidades, aumente o teor de matéria orgânica do solo, o que aumenta a atividade microbiana e consequentemente liberam nutrientes em formas disponíveis às plantas, também há o aumento da fixação do N atmosférico de maneira simbiótica pelas leguminosas (Chaves et al., 2022).

No geral, as taxas de desnitrificação e abundâncias de desnitrificantes devem ser menores sob gramíneas do que sob árvores (Srikanthasamy et al., 2018), essa tendência também foi observada na Figura 8.

Já a técnica de PCR quantitativo em tempo real foi utilizada para comparar a abundância dos genes funcionais do ciclo do nitrogênio entre as diferentes áreas de estudo e foram utilizados genes relacionados à fixação de nitrogênio (*nifH*) e desnitrificação (*nirK* e *nosZ*). As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR desses genes apresentaram excelentes coeficientes de correlação, acima de $r^2 = 0,99$ e eficiências entre 85 e 95%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados na Figura 9.

Em geral, observamos na Figura 9 que o número de cópias do gene *nifH* foi maior na área de restauração ativa de 7 anos quando comparado aos solos de floresta semidecídua e da restauração de 14 anos ($P \leq 0,05$, Tabela 7). Quanto à abundância de genes *nirK* e *nosZ*, esses não apresentaram diferenças estatísticas entre os diferentes usos de solo, apenas nas diferentes estações (seca e chuvosa).

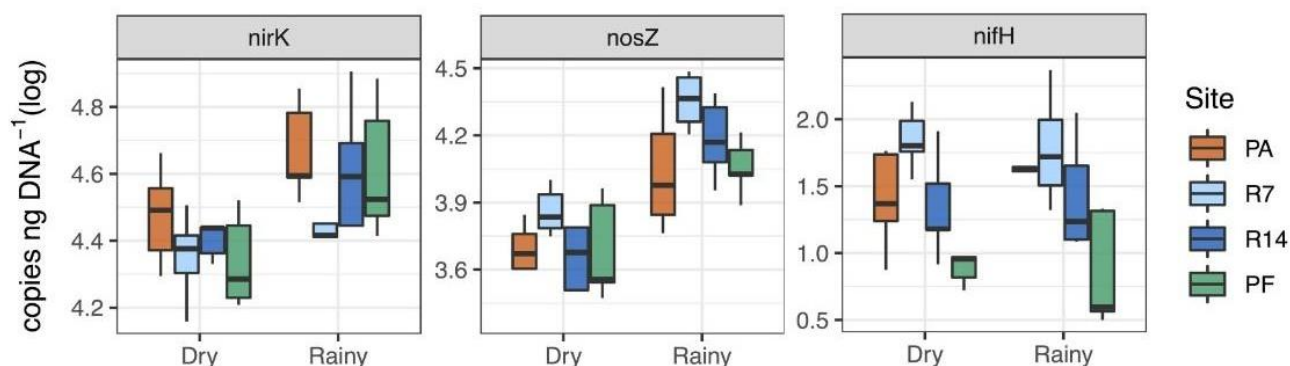


Figura 9: Número de cópias dos genes 16S RNA dos genes *nifH*, *nirK* e *nosZ* (ng/DNA) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Tabela 6. Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) de dados de quantificação de genes *nifH*, *nirK* e *nosZ* (copies ngDNA-1) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e uma plantação única com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Quantificação de genes (cópias ngDNA-1)</i>									
<i>nifH</i>	3	9,149	<0,001	1	0,092	0,674	3	0,350	0,789
<i>nirK</i>	3	2,523	0,079	1	15,308	<0,001	3	0,497	0,687
<i>nosZ</i>	3	2,839	0,054	1	73,736	<0,001	3	0,512	0,679

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

O gene *NifH* é utilizado como marcador gênico para detecção de microrganismos fixadores de nitrogênio no ambiente, já o gene *NosZ* é utilizado como marcador gênico para detecção de microrganismos que atuam no processo de desnitrificação, mais precisamente da redução de óxido nitroso (N_2O) a N_2 . No caso do gene *NirK* também é utilizado como marcador gênico para desnitrificadores, porém atua na redução de nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) (Kuypers; Marchant; Kartal, 2018).

O número de cópias do gene *nifH*, presente em microrganismos fixadores de N, foi maior na restauração mais jovem, seguido do pasto. Além da influência do manejo inicial da área (R7) com o consórcio de árvores e plantas leguminosas, outro fator que pode ter influência no aumento da taxa de fixação é a compactação do solo, já que a presença de oxigênio (O_2) inibe a atividade desta enzima (St-Martin; Bommarco, 2016).

O N_2O é considerado um importante gás de efeito estufa e é transformado apenas pela ação de microrganismos, sendo considerado o único sumidouro conhecido para N_2O na biosfera (Hallin et al., 2018). A quantificação de bactérias capazes de desnitrificação é importante para um melhor entendimento da atividade desnitrificante e dos fluxos de N_2O no ambiente (Henry et al., 2004). Neste caso pode ser notado um resultado interessante, já que a R7 demonstrou um comportamento para um maior número de cópias do gene *nosZ*, que apesar de não ter aparecido uma diferença significativa, podemos observar uma tendência nesse processo de desnitrificação na área.

2.4. Conclusão

A área de restauração de 7 anos se mostrou menos fértil se comparada com as demais e com menor disponibilidade de nutrientes. Por sua vez, a floresta, como era de se esperar, se mostrou um ambiente estável.

As principais mudanças na estrutura e composição das comunidades microbianas estão mais relacionadas as mudanças do uso da terra do que a estação em si. Podemos destacar o fato de que as quatro áreas apresentaram padrões distintos de riqueza e diversidade microbiana, onde a pastagem e a área de restauração de 14 anos apresentaram maior diversidade do que o ambiente florestal de referência. Já na abundância de bactérias, o pasto apresentou os maiores resultados em relação às florestas e na comunidade de archaea se mostrou contrária, com uma abundância maior na floresta.

Com relação aos grupos microbianos específicos relacionados ao ciclo N, observamos que a introdução de adubação verde e a divisão do plantio de árvores nativas em duas rodadas durante o manejo da restauração trouxeram novos benefícios, como aumento da fixação biológica de nitrogênio, como no caso da restauração de 7 anos. Também, a área mais jovem e o pasto se apresentaram como solos mais compactados e menos porosos, favorecendo ainda mais a fixação de nitrogênio nessas áreas. No caso da desnitrificação não tivemos diferenças significativas entre os diferentes solos.

Os atributos estudados, tanto químico e físico, quanto o biológico, em sua maioria, diferiu as áreas reflorestadas e sob pastagem do fragmento florestal, mostrando que o período de recuperação não foi suficiente para restabelecer esses atributos. Com tudo tivemos indícios que as florestas plantadas jovens são mais eficientes do que as pastagens em prover as funções do solo e evoluir para o estado de floresta nativa.

É nítido que os atributos do solo, em florestas nativas, são importantes indicadores que devem ser levados em conta em estudos de produtividade da floresta. Devendo ser analisados em planos de manejo florestal e de restauração de florestas nativas degradadas, principalmente quando o foco é o restabelecimento das funções da floresta.

Referências

- Alvares, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507.
- Alexandre, J. R. et al. Zinco e ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo. **Natureza on-line**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 2012.
- Apprill, A. et al. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v.75, n. 2, p. 129–137, 2015. doi: 10.3354/ame01753.
- Araújo, A. S. F.; Monteiro, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007.
- Araújo, E. A. et al. Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 5, n. 1, p. 187-206, 2012.
- Bascompte, J. Redes em ecologia. **Ecologia Básica e Aplicada**, v. 8, n. 6, p. 485-490, 2007.
- Bastian, M.; Heymann, S.; Jacomy, M. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. In: International ICWSM Conference on Weblogs and Social Media, 3., 2009, San Jose, CA, USA. **Proceedings ...** San Jose, CA: ICWSM, 2009. v. 3, n. 1, p. 361-362. doi: 10.1609/icwsm.v3i1.13937.
- Bertacchi, M. I. F. et al. Caracterização das condições de microssítio de áreas em restauração com diferentes idades. **Revista Árvore**, v. 36, p. 895-906, 2012.
- Brancalion, P. H. S. et al. Instrumentos legais podem contribuir para a restauração de florestas tropicais biodiversas. **Revista Árvore**, v. 34, p. 455-470, 2010.
- Brancalion, P. H. S.; Gandolfi, S.; Rodrigues, R. R. **Restauração Florestal**. São Paulo: Oficina de Textos, 2015. v. 1, 432 p.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v.13(7), p.581–583, 2016. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carvalho, W. T. V. et al. Pastagens degradadas e técnicas de recuperação: revisão. **Pubvet**, v. 11, p. 947-1073, 2017.
- Caporaso, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, p. 4516-4522, 2011. Suppl. 1.
- Chaves, J. S. et al. Parâmetros microbiológicos do solo em sistema de produção consorciada sob manejo orgânico. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 10, p. 1-9, 2022. doi: 10.33448/rsd-v11i10.32643.
- Chazdon, R. L. et al. A Novel Statistical Method for Classifying Habitat Generalists and Specialists. **Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1332–1343, 2011.

Crews T. E.; Peoples M. B. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? a review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 72, p. 101-120, 2005. doi:10.1007/s10705-004-6480-1.

Dias, A. C. Transformações do nitrogênio no solo. In: Cardoso, E. J. B. N. C.; Andreote, F. D. A. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. cap. 7, p. 99-109.

Dinno, A. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5, 2017.

Donagema, G. K. et al. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230 p. Friedman, J.; Alm, E. J. Inferring correlation networks from genomic survey data. **PLoS Computational Biology**, v. 8, p. 1-12, 2012.

HALLIN, S. et al. Genômica e ecologia de novos microrganismos redutores de N₂O. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 43-55, 2018.

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

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

Joly, C. A.; Metzger, J. P.; Tabarelli, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, p. 459-473, 2014. doi: 10.1111/nph.12989.

Kay, M., & Wobbrock, J. O. Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs. R package version 0.10.5., 2018.

Ker, J. C. et al. **Pedologia: fundamentos**. Viçosa: SBCS, 2012. 343 p.

Khan M. A. W. et al. Deforestation impacts network co-occurrence patterns of microbial communities in Amazon soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 2, p.1-12, 2019. doi: 10.1093/femsec/fiy230.

Klindworth, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p.1-11, 2012.

Kneitel, J. M.; Chase, J. M. Trade-offs in community ecology: Link-ing spatial scales and species coexistence. **Ecology Letters**, v.7, p. 69–80, 2004.

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.

Lambais, M. R. et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 43-84, 2005.

Laurance, W. F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation**, v.142, p.1137, 2009.

Lenth, R. Ismeans: Least-Squares Means. R package version 2.30-0, 2018.

Lepsch, I. F. **19 lições de pedologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2011. 793 p.

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

Little, A. E.F. et al. Regras de engajamento: interações interespecies que regulam comunidades microbianas. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 375-401, 2008.

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

Moreau, D. et al. A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. **Functional Ecology**, v. 33, n. 4, p. 540-552, 2019.

Moreira, F. L. et al. Serapilheira e atributos edáficos na avaliação de técnicas de restauração florestal. In: Oliveira, R. J. **Silvicultura e manejo florestal: técnicas de utilização e conservação da natureza**. Guarujá: Editora Científica, 2021. v. 1, cap. 27.

Myers, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000. doi: 10.1038/35002501.

Oliveira, M. S. et al. Qualidade do solo: indicadores biológicos para um manejo sustentável. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6853-6875, 2021.

Oliveira, P. P. A.; Corsi, M. **Recuperação de pastagens degradadas para sistemas intensivos de produção de bovinos**. São Carlos: EmbrapaPecuária Sudeste, 2005. 23 p. (Circular Técnica, 38).

Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., & Stevens, M. H. H. **vegan: Community Ecology Package**, 2018.

Ostertag, R. Effects of nitrogen and phosphorus availability on fine root dynamics in Hawaiian montane forests. **Ecology**, v. 82, n. 2, p. 485-499, 2001.

Pandit, S. N.; Kolasa, J; Cottenie, K. Contrasts between habitat generalists and specialists: an empirical extension to the basic metacommunity framework. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2253-2262, 2009.

Parada, A. E.; Needham, D. M.; Fuhrman, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v.18, n. 5, p.1403-1414, 2016. doi: 10.1111/1462-2920.13023.

Pereira, A. B. Mata Atlântica: uma abordagem geográfica. **Nucleus**, v. 6, n. 1, p. 1-27, 2009.

Poorter, L. et al. Biomass resilience of Neotropical secondary forests. **Nature**, v. 530, p. 211–214, 2016. doi: 10.1038/nature16512.

Tu, Q. et al. NCycDB: um banco de dados integrado com curadoria para perfis metagenômicos rápidos e precisos de genes de ciclagem de nitrogênio. **Bioinformática**, v. 35, n. 6, p. 1040–1048, 2019. doi: 10.1093/bioinformatics/bty741.

Raij, B. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996.

RStudio Team (2018). RStudio: Integrated development for R. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>.

Rocha, J. H. T. et al. Reflorestamento e recuperação de atributos químicos e físicos do solo. **Floresta e Ambiente**, v. 22, p. 299-306, 2015.

Rodrigues, H. J. B. et al. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, n. 4, 2011. doi: 10.1590/S0102-77862011000400012.

Rodrigues, R. R. et al. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1242-1251, 2009.

Ronquim, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento Por Satélite, 2010. 26 p.

Santos, H. G. et al. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed., rev. e ampl. Brasília: Embrapa Solos, p. 1-356, 2018.

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

Silva, D. F. et al. **Análise de nitrato e amônio em solo e água**. 1 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010, p. 1-56.

Silva, J. J. N. et al. Ciclagem de nitrogênio em florestas tropicais e plantações de eucalipto no Brasil no antropoceno. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 6, p. 1-17, 2018.

Srikanthasamy, T. et al. Contrasting effects of grasses and trees on microbial N-cycling in an African humid savanna. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 117, p. 153-163, 2018.

Stahl, D.A.; Amman, R.A. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

St-Martin, A.; Bommarco, R. Soil compaction and insect pollination modify impacts of crop rotation on nitrogen fixation and yield. **Basic and Applied Ecology**, v. 17, p. 617-626, 2016.

Sobucki, L. et al. Manejo e qualidade biológica do solo: uma análise. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 3, art. rab201904, 2019.

Soil Survey Staff. **Keys to soil taxonomy**. 12. ed. Washington, DC: USDA, 2014.

SOS Mata Atlântica. **Relatório Anual de 2020**. Itú: Fundação SOS Pro-Mata Atlântica, 2020. 81 p. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/sobre/relatorios-e-balancos/>. Acesso em: 16 maio 2022.

Tambosi, L. R. et al. A framework to optimize biodiversity restoration efforts based on habitat amount and landscape connectivity. **Restoration Ecology**, v. 22, p. 169–177, 2014. doi: 10.1111/rec.12049.

Teixeira, P. C. et al. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Solos, 2017. 577 p.

Veloso, H. P.; Rangel A. L. R. F.; Lima, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE; Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.

Venturini, A. M. et al. Robust DNA protocols for tropical soils. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. 1-6, 2020. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03830.

Wallenstein, M. D.; Vitgalys, R. J. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. **Pedobiologia**, v. 49, p. 665-672, 2005.

Wickham, H., & Chang, W. ggplot2': Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. R package version 3.1.0., 2016.

Zanini, A. M. et al. The effect of ecological restoration methods on carbon stocks in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 481, art. 118734, 2021. doi: 10.1016/j.foreco.2020.118734.

Zhou, J. et al. Rede ecológica molecular filogenética de comunidades microbianas do solo em resposta a CO₂ elevado. **MBio**, v. 2, n. 4, art. e00122-11, 2011.

3. O PAPEL DA RESTAURAÇÃO FLORESTAL ATIVA NO ARMAZENAMENTO DE CARBONO E PROPRIEDADES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO: UMA AVALIAÇÃO MULTICAMADA NA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA

Resumo

Este estudo fornece uma abordagem integrativa de cima para baixo no armazenamento de C, fluxos de gases de efeito estufa e quantidade, qualidade e origem da matéria orgânica do solo sob diferentes modelos de restauração florestal ativa no bioma Mata Atlântica brasileiro. Sincronicamente, investigamos as relações entre as propriedades da MOS e os indicadores de saúde do solo. Dois modelos de restauração foram avaliados: (i) tradicional (15 anos [R15]), plantando uma alta diversidade de árvores nativas de uma só vez; e (ii) escalonado (8 anos de idade [R8]), consorciado a adubação verde e seccionando o plantio de árvores nativas no tempo de acordo com seu grupo ecológico funcional. Uma pastagem reformada (PA) foi utilizada como alternativa para recuperação de terras e uma floresta primária (PF) como referência. A PF apresentou os maiores estoques de C total ($107,7 \text{ Mg C ha}^{-1}$), seguido por R15, R8 e PA com $69,8$, $55,5$ e $41,8 \text{ Mg C ha}^{-1}$, respectivamente. Os estoques de C do solo foram semelhantes nas restaurações e pastagem, mas 20% menores que na floresta. O escalonamento da restauração suprimiu melhor as gramíneas invasoras, evidenciado por menores proporções de C do solo originado de plantas C_4 . C e índice de humificação da MOS do solo (H_{LIFS}) semelhantes entre restaurações e floresta primária foram encontrados na camada superficial do solo (0-10 cm), mas não nas camadas mais profundas (10-20 e 20-30 cm), mostrando um efeito do perfil do solo de cima para baixo na quantidade e qualidade da MOS. A análise de redundância revelou que as restaurações seguiram uma reabilitação progressiva das propriedades da MOS e da saúde do solo. A floresta primária apresentou maior força de influxo de C- CH_4 ($-141,1 \mu\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), seguida pela restauração de 15 anos ($-61,9 \mu\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Concluímos que, independentemente do modelo aplicado, a restauração florestal foi melhor do que a pastagem para sequestro de C e para a melhoria da saúde do solo. No entanto, as restaurações de 8 e 15 anos só atingiram o estado da floresta na camada superficial do solo, pois o solo mais profundo ainda carrega legados de degradação histórica anterior.

Palavras-chave: Restauração de ecossistemas, sequestro de carbono, gases de efeito estufa, índice de humificação da MOS, saúde do solo, $\delta^{13}\text{C}$.

Abstract

This study provides an integrative approach from above to belowground on C storage, greenhouse gas fluxes, and quantity, quality, and origin of soil organic matter (SOM) under different models of active forest restoration in the Brazilian Atlantic Forest biome. Synchronously, we investigated the relations between SOM properties and soil health indicators. Two restoration models were assessed: (i) traditional (15-year-old [R15]), planting a high diversity of native trees in one go; and (ii) staggered (8-year-old [R8]), intercropping green manure and sectioning the planting of native trees in time according to their ecological functional group. A reformed pasture (PA) was used as an alternative to land recovery, and a primary forest (PF) as a reference. The PF showed the highest total C stocks ($107.7 \text{ Mg C ha}^{-1}$), followed by R15, R8, and PA with 69.8 , 55.5 , and $41.8 \text{ Mg C ha}^{-1}$, respectively. Soil C stocks were similar in restorations and pasture but 20% lower than the forest. Staggering the restoration suppressed better the invasive grasses, evidenced by lower proportions of soil C originated from C_4 plants. Similar soil C and SOM humification index (H_{LIFS}) between restorations and primary forest were found in the topsoil (0-10 cm) but not in deeper layers (10-20 and 20-30 cm), showing a top-to-bottom soil profile effect on quantity and quality of SOM. Redundancy analysis revealed that restorations followed a progressive rehabilitation of SOM properties and soil health. The primary forest showed higher C- CH_4 influx strength ($-141.1 \mu\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), followed by the 15-year-old restoration ($-61.9 \mu\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). We conclude that regardless of the applied model, the forest restoration was better than reforming pasture for sequestering C and enhancing soil health. However, 8- and 15-year-old restorations only reached the state of the forest in the topsoil layer, as deeper soil still carries legacies of previous historic degradation.

Keywords: Ecosystem restoration, carbon sequestration, greenhouse gases, SOM humification index, soil health, $\delta^{13}\text{C}$.

3.1. Introdução

A Mata Atlântica é o bioma brasileiro mais devastado ambientalmente, no qual os habitats naturais estão criticamente fragmentados (Myers et al., 2000; Laurance, 2009; Rezende et al., 2018). O bioma contém 11,6 milhões de hectares (Mha) de pastagens com grau intermediário de degradação e 4,1 Mha com degradação severa, cobrindo 53% da área total de pastagens (MapBiomas, 2021). Recuperar essas pastagens degradadas e restaurar florestas são ferramentas estratégicas para ajudar o Brasil a cumprir acordos para mitigar a crise climática (Rezende et al., 2018; Sá et al., 2017). Além disso, restaurar florestas é uma maneira eficaz de mitigar o aquecimento global ao sequestrar carbono (Zanini et al., 2021) e restabelecer os serviços ambientais através da introdução da biodiversidade funcional (Rodrigues et al., 2009; Lima et al., 2020), especialmente em ecossistemas muito fragmentados como a Mata Atlântica (Pütz et al., 2014; Myers et al., 2000). No entanto, pastagens severamente degradadas carecem de bancos de sementes de árvores de florestas primárias anteriores (ou seja, contêm baixa resiliência para regeneração natural da floresta), e a saúde do solo é altamente danificada, exigindo intensa intervenção humana para ser ecologicamente restaurada (Poorter et al., 2016; Tambosi et al., 2014). Nesse cenário, a metodologia de restauração ativa é a melhor alternativa de custo-benefício para recuperar o funcionamento ecológico da floresta (Ribeiro et al., 2009), que consiste em plantar diversas espécies de plantas nativas em toda a área, maximizando a rápida cobertura florestal e a velocidade de restauração, e então ativando a sucessão ecológica natural (Brancalion; Gandolfi; Rodrigues, 2015; Brancalion et al., 2016; Zanini et al., 2021).

Nas últimas quatro décadas, cientistas brasileiros moldaram novos modelos dentro da metodologia ativa para a melhor ecoeficiência da restauração florestal (Rodrigues et al., 2009; Brancalion; Gandolfi; Rodrigues, 2015; Brancalion et al., 2016). Um modelo de restauração consiste em combinações espaço-temporais (por exemplo, composição e distribuição das árvores plantadas no espaço e no tempo) juntamente com práticas de manejo do solo (como construção de cercas para proteção, calagem e adubação do solo, controle de plantas daninhas, entre outros) durante o processo de restauração (Rodrigues et al., 2009). Essas atualizações de implementação prometem recuperação e autoperpetuação mais rápidas da floresta (Di Sacco et al., 2021). Para áreas severamente degradadas, um desses modelos foi

chamado de modelo escalonado (Zanini et al., 2021) porque seccionou o plantio de grupos ecológicos funcionais de árvores em duas fases, também consorciado com adubação verde para suprimir gramíneas invasoras e fornecer nutrientes ao solo (Rodrigues et al., 2009; Brancalion; Gandolfi; Rodrigues, 2015; Brancalion et al., 2016). O modelo escalonado começou a ser implementado e experimentado na Mata Atlântica a partir de 2013. Consequentemente, os processos de restauração ainda são jovens (≤ 10 anos), faltando bastante a ser compreendido sobre a eficácia da recuperação e sustentabilidade do ecossistema (Zanini et al., 2021; Poorter et al., 2021).

A matéria orgânica do solo (MOS) é considerada um indicador chave da saúde do solo e da sustentabilidade do ecossistema, desempenhando múltiplas funções e influenciando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Cherubin et al., 2016; Bieluczyk et al., 2020). Através do processo de decomposição, a MOS é constantemente transformada de formas lábeis, facilmente decomponíveis, para formas mais estabilizadas e humificadas quimicamente, habitualmente associadas a minerais do solo (Cambardella; Elliott, 1992; Wander, 2004). A forma lábil da matéria orgânica fornece principalmente energia para a atividade microbiana do solo (Kravchenko et al., 2019), favorecendo a ciclagem de nutrientes (Banning et al., 2008), já que partículas orgânicas mais transformadas melhoram a estrutura física do solo e a capacidade de troca catiônica, especialmente em solos tropicais (Cotrufo et al., 2013; Tadini et al., 2021). Para avaliar essas frações da MOS, a espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) foi desenvolvida para caracterizar qualitativamente a transformação da MOS e, quando associada ao índice de humificação da MOS (H_{LIFS}), reunir o equilíbrio do compartimento da MOS em um número de índice único (Segnini et al., 2013; Tadini et al., 2015; 2021). O H_{LIFS} é uma ferramenta desenvolvida recentemente para estudar a qualidade do MOS, que tem mostrado excelentes respostas a diversas avaliações de ecossistemas (Milori et al., 2006; Tivet et al., 2013; Santos et al., 2015; Tadini et al., 2015, 2018, 2021; Xavier et al., 2019). Portanto, pode ser usado, em solos sob restauração, para analisar se a qualidade da MOS está se aproximando de um estado semelhante ao da floresta nativa (o objetivo da restauração).

A composição isotópica da matéria orgânica (por exemplo, $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) em solos e plantas de ecossistemas em processo de restauração fornece informações complementares, às vezes essenciais, para identificar a origem e as alterações das

propriedades da MOS devido ao feedback planta-solo (Zanini et al., 2021; Bieluczyk et al., 2020). O $\delta^{13}\text{C}$ é utilizado estrategicamente em áreas onde a restauração foi implantada em uma pastagem, anteriormente degradada, de longa duração, pois discrimina a MOS originada de C_3 ($\delta^{13}\text{C} = -24$ a -34‰ , para árvores plantadas) e de plantas C_4 ($\delta^{13}\text{C} = -9$ a -15‰ , para pastagem anterior) (Martinelli et al., 2009; Smith; Epstein, 1971). Além disso, analisando o $\delta^{13}\text{C}$ de fontes de MOS (por exemplo, serapilheira e biomassa herbácea) e investigando o $\delta^{13}\text{C}$ no solo, a proporção C_4/C_3 precisa do solo pode ser calculada (Balesdent; Wagner; Mariotti, 1988). Por fim, o acoplamento de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ fornece informações para um melhor entendimento da ciclagem da MOS no ecossistema. Ao usar $\delta^{15}\text{N}$, podemos rastrear as fontes de entrada de N no solo (por exemplo, fixação biológica de N com abundância de ^{15}N em torno de 0‰), bem como as transformações devido a várias etapas no processo de ciclagem da MOS com faixas de fracionamento específicas (Bieluczyk et al., 2020; Szpak, 2014).

Vários estudos recentes investigaram o sequestro de C acima do solo, como o armazenamento de C em árvores, em restauração ecológica ativa na Mata Atlântica (por exemplo, Nogueira Júnior et al., 2014; Shimamoto; Botosso; Marques, 2014; Ferez et al., 2015; César et al., 2018; Azevedo et al., 2018; Brancalion et al., 2021; Poorter et al., 2021; Zanini et al., 2021). No entanto, poucos estudos incluem reservatórios de C abaixo e acima do solo (por exemplo, Brancalion et al., 2021; Zanini et al., 2021; Poorter et al., 2021). Normalmente, o ecossistema acima e abaixo do solo não são estudados em conjunto, ou o desenvolvimento do solo durante a restauração não é considerado (Mendes et al., 2019; Nolan et al., 2021). Por meio de medições ecossistêmicas em várias camadas dos estoques de C e avaliação do processo de acumulação de C no sistema de restauração, podemos destacar sua contribuição potencial para mitigar as emissões de gases de efeito estufa (GEE). Mesmo que sejam pontuais, avaliações de campo de GEE sobre restauração florestal são escassas na literatura (Bernal; Murray; Pearson, 2018), apesar de sua essencialidade para a compreensão da dinâmica C do ecossistema (Oertel et al., 2016). Até onde sabemos, o uso de dados de solo, planta e fluxo de GEE para uma compreensão integrativa da compensação de C sob restauração florestal na Mata Atlântica não foi realizado anteriormente. Portanto, aqui, foi construído um conhecimento sólido solo-planta-atmosfera do papel do C no ecossistema sob modelos de restauração ativa da floresta.

Neste estudo, foi utilizada uma abordagem integrativa de cima para baixo para avaliar o armazenamento de C, fluxos de GEE, quantidade, qualidade e origem da MOS sob diferentes modelos de restauração florestal. Ao mesmo tempo, foram investigadas relações entre as propriedades da MOS e os indicadores de saúde do solo. Para isso, foi realizado um experimento de campo avaliando dois modelos de restauração florestal ativa: (i) uma abordagem tradicional (15 anos), plantando alta diversidade de árvores nativas de uma só vez; e (ii) manejo escalonado (8 anos), fazendo um consórcio com adubação verde e seccionando o plantio de árvores nativas no tempo de acordo com seu grupo ecológico funcional. Uma pastagem reformada foi utilizada como alternativa para recuperação de terras, e uma floresta primária como referência ideal. Com base nisso, foi hipotetizado que oito anos após a implementação do uso de um modelo de restauração ecológica mais avançado foram suficientes para alcançar uma recuperação semelhante ou superior da restauração tradicional de 15 anos devido à aceleração do acúmulo de C acima e abaixo do solo, beneficiando rapidamente a saúde do solo e mitigando as emissões de GEE. Para testar essa hipótese, foram utilizadas as seguintes ferramentas: (i) quantificação de reservatórios de C acima e abaixo do solo para investigar o armazenamento de C em multicamadas; (ii) frações isotópicas da MOS ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para detecção da origem e ciclagem da MOS; (iii) HLIFS para avaliação da qualidade da MOS, enfatizando o equilíbrio entre seus compartimentos; (iv) fluxos de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) do solo, para identificar possíveis mitigações de emissões de GEE; e, (v) influência das propriedades da MOS nos indicadores de saúde química, física e biológica do solo.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Área de estudo e tratamentos

A área de estudo e os tratamentos são iguais ao Capítulo 1 (2.2.1 – Capítulo 1), porém, foram coletadas em anos diferentes (2020 e 2021), por isso a mudança de nomenclatura (idade) das áreas.

3.2.2. Avaliação do solo

3.2.2.1. Amostragem de solo

A amostragem para avaliação dos atributos foi realizada estrategicamente na segunda semana de fevereiro de 2021, com altas temperaturas do ar e poucos dias

após fortes volumes de chuva (Figura suplementar S7), visando representar o momento de maior atividade biológica nesses ecossistemas. Os solos foram amostrados nas profundidades de 0-10, 10-20 e 20-30 cm. Cinco repetições, distanciadas pelo menos 30 m uma da outra e das bordas do experimento, foram amostradas em cada tratamento avaliado. Amostras destrutivas do solo foram coletadas para análise química, textura e microbiológica do solo, enquanto o solo não perturbado foi coletado em anéis volumétricos de 5 x 5 cm para análise física do solo. O solo para DNA e análise microbiológica foi coletado assepticamente, imediatamente acondicionado em caixa térmica e transportado em gelo para o laboratório, onde foi armazenado a -20 °C.

3.2.2.2. Atributos químicos e físicos do solo

O solo para as análises químicas e de textura foi preparado por secagem ao ar, moagem e peneiramento (malha de 2 mm). Parâmetros de fertilidade do solo (ou seja, potencial de hidrogênio na água [$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$], acidez potencial [$\text{H} + \text{Al}$], cálcio disponível [Ca], magnésio [Mg], alumínio [Al], fósforo [P] e potássio [K]) foram medidos por métodos analíticos descritos em Raij et al. (2001). A textura do solo (ou seja, teores de argila, silte e areia), microporosidade e densidade do solo foram medidas conforme descrito em Donagema et al. (2011). Os parâmetros químicos e físicos do solo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos atributos[§] químicos e físicos (textura do solo e densidade do solo) na camada de solo de 0-30 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa com plantio escalonado com oito anos (R8) e um único plantio com quinze anos (R15).

Atributos	PF	R15	R8	PA
<i>pH</i> (H ₂ O)	4,85	5,05	4,29	5,47
P (<i>mg kg⁻¹</i>)	11,84	7,51	12,91	27,72
Ca (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	24	25,26	12,59	29,24
Mg (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	11,38	13,55	4,85	17,69
K (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	3,01	3,56	1,19	3,81
Al (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	5,35	3,4	9,90	0,17
SB (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	38,39	42,37	18,64	50,74
H+Al (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	45,18	31,42	50	23,65
Ds (<i>Mg m⁻³</i>)	1,22	1,33	1,45	1,38
CTC (<i>mmol_c kg⁻¹</i>)	83,58	73,79	68,64	74,39
Argila (<i>g kg⁻¹</i>)	185,5	224,9	252,8	241,8
Silte (<i>g kg⁻¹</i>)	176,8	187,4	92,5	161,7
Cascalho (%)	39,2	28,2	33,4	36,3
Areia (<i>g kg⁻¹</i>)	637,7	587,7	654,7	596,5

Análises químicas e físicas do solo (n = 5) foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em Raij et al. (2001). pH (H₂O): potencial de hidrogênio na água (H₂O) – acidez ativa; cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al); fósforo disponível (P) e potássio (K) – resina de troca aniônica; H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases; CTC: capacidade potencial de troca catiônica; Ds: densidade aparente.

3.2.2.3. Estoques de carbono e nitrogênio do solo e sua composição isotópica

Raízes grossas foram removidas de subamostras de solo secas ao ar e peneiradas (2 mm) (5 g). Este solo foi macerado e peneirado mais fino ($\leq 149 \mu\text{m}$) para análise dos teores de C e N, bem como da composição isotópica de ¹⁵N e ¹³C. Esses elementos foram analisados com um analisador automático de nitrogênio-carbono com interface de combustão para um espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage; Milão, Itália). As análises de carbono, nitrogênio, ¹⁵N, e ¹³C foram realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os resultados dos isótopos estáveis foram expressos como $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

(‰), utilizando os padrões internacionais (Vienna PeeDee Belemnite – V-PDB para C [NBS19 e NBS22], como referência para valores de ^{13}C , e composição do ar atmosférico para N_2 [IAEA-N1 e IAEA-N2], como referência para $\delta^{15}\text{N}$). Os valores delta foram baseados em padrões (Farquhar; O’Leary; Berry, 1982) e calculados usando a seguinte equação: $\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1]$ multiplicado por 1000, onde X se refere a ^{13}C ou ^{15}N e R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de amostra e padrão, respectivamente.

Os estoques de C e N do solo (Mg ha^{-1}) foram calculados multiplicando os teores de C ou N do solo (%), densidade aparente (Mg m^{-3}), e a espessura da camada de solo (cm). Como a densidade do solo foi maior nas áreas de pastagem e restauradas em relação à floresta nativa (Tabela 1), os estoques de C não corrigidos seriam sistematicamente superestimados nessas áreas manejadas. Em seguida, os estoques foram corrigidos pelo método de massa equivalente de solo, conforme descrito em Ellert e Bettany (1995), utilizando como referência a área de floresta semidecídua. Além disso, para não superestimar os estoques de C e N do solo, consideramos em nosso cálculo - e descontado - a massa ocupada pelo cascalho em cada camada do solo. Por exemplo, para toda a camada de solo avaliada (0-30 cm), o cascalho representou em média 39, 28, 33 e 36% da massa do solo, nos locais PF, R15, R8 e PA, respectivamente (Tabela 1).

3.2.2.4. Índice de humificação do solo

Parte das subamostras de solo (aproximadamente 0,5 g peneiradas a $\leq 149 \mu\text{m}$) foi peletizada (pellets de 1 cm x 2 mm) em uma prensa hidráulica antes de uma análise de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) (Tadini et al., 2021). Um laser de onda contínua (20 mJ de potência) com excitação em 405 nm foi utilizado para adquirir os espectros LIFS em um sistema protótipo móvel (Santos et al., 2015). O comprimento de onda variou de 420 a 800 nm, e a intensidade máxima de emissão foi de 4096 contagens. Para todas as medições, o tempo de integração, a média e o vagão selecionado foram 900 ms, 3 e 7, respectivamente.

Confeccionamos quatro pellets para cada amostra de campo. Após a análise LIFS, calculamos as médias entre elas para representar o espectro da amostra de campo. O índice de humificação (H_{LIFS}) foi determinado como descrito em Milori et al. (2006) e calculado usando a seguinte equação: $H_{\text{LIFS}} = \text{AEE}/\text{C}$, onde AEE se refere à

área do espectro de emissão (unidades arbitrárias ou u.a.) a 405 nm com excitação de 420-800 nm e C à quantidade total de carbono (%) na amostra de solo.

3.2.2.5. Abundância de microorganismos do solo

Usamos PCR quantitativo (qPCR) visando genes marcadores funcionais para revelar a abundância de microrganismos metanogênicos (do inglês: methyl coenzyme-M reductase – *mcrA*), metanotróficos (do inglês: particulate methane monooxygenase – *pmoA*) e fixadores de nitrogênio (nitrogenase reductase – *nifH*) no solo. Os genes *nifH*, *pmoA* e *mcrA* foram usados apenas como informações complementares para apoiar nossa discussão. Métodos detalhados para medir esses genes são apresentados no material suplementar (Tabela suplementar S7).

3.2.3. Avaliação da planta

3.2.3.1. Estoque de carbono das árvores

Três parcelas (30 × 10 m) foram instaladas aleatoriamente para cada tratamento e colocadas a 30 m do limite da área para evitar efeitos de borda. Todas as árvores vivas que apresentavam pelo menos um caule com diâmetro à altura do peito (DAP, 1,3m) ≥ 5 cm foram avaliadas nas parcelas. Então, se o caule de uma árvore atendesse a esses critérios de inclusão, todos os caules eram medidos. O DAP foi medido com fita adesiva e as árvores foram identificadas e classificadas em nível de espécie. A densidade da madeira (DM) da espécie foi recuperada de várias fontes, incluindo bancos de dados online (base de dados ICRAF [2022] e Chave et al. [2006]), como livros botânicos (Lorenzi, 1992; 1998; 2011). A biomassa das árvores foi determinada de forma diferente para as plantações de restauração (R15 e R8) e áreas de floresta primária (FP) e posteriormente multiplicada por 0,47 (IPCC, 2007) para obter os estoques de carbono das árvores (Mg ha⁻¹). Nas áreas de restauração, utilizou-se a equação alométrica desenvolvida por Nogueira Júnior et al. (2014) para estimar a biomassa de árvores em florestas ativamente restauradas. Os autores estudaram o mesmo domínio florestal no estado de São Paulo, originalmente coberto por uma floresta semidecídua. Então, a equação utilizada no plantio de restauração foi:

$$\log(\text{BAS}) = -0,970 + 1,1421 \log(\text{DAP}^2 \times \text{DM})$$

Como a estrutura da floresta nativa difere das áreas de restauração jovem ao longo do estágio avançado de sucessão (Ferez et al., 2015), utilizamos uma equação desenvolvida por Chave et al. (2005) para a floresta semidecídua madura. Essa equação é amplamente utilizada na literatura e recomendada pelos autores como um dos melhores modelos preditivos para povoamentos de floresta úmida madura. A equação foi:

$$\text{BAS} = \text{DM} \times \exp(-1,499 + 2,148 \ln(\text{DAP}) + 0,207(\ln(\text{DAP}))^2 - 0,0281(\ln(\text{DAP}))^2)$$

Nas equações 1 e 2 acima, BAS é a biomassa acima do solo (kg por árvore), DAP é o diâmetro à altura do peito (m), e DM é a densidade da madeira (g cm^{-3}).

3.2.3.2. Herbáceas e serapilheira: estoques de carbono e nitrogênio

A serapilheira e os reservatórios herbáceos foram amostrados em um quadrado de 25 x 25 cm em cinco pontos aleatórios distanciados pelo menos 30 m um do outro e das bordas do experimento. Essas amostras foram secas em estufa a 50 °C por 96 h até a estabilização do peso. Em seguida, a biomassa seca (g) foi pesada em balança de precisão com quatro casas decimais e calculada para Mg ha^{-1} . As amostras secas foram moídas (0,25 mm) em micromoinho e analisadas para C e N total, como composição isotópica ^{15}N e ^{13}C com o mesmo equipamento utilizado para analisar amostras de solo (ver acima na seção 3.2.2.3). Os estoques de serapilheira e C e N herbáceo (Mg ha^{-1}) foram calculados multiplicando-se seu teor (%) pela biomassa total (Mg ha^{-1}).

3.2.4. Atmosfera: avaliação de gases de efeito estufa

Vários estudos têm mostrado que as diferenças mais significativas nos fluxos de gases de efeito estufa nos usos da terra tropical tem sido verificadas na estação chuvosa, relacionadas à maior umidade do solo e temperaturas climáticas (Keller; Reiners, 1994; Steudler et al., 1996; Verchot et al., 2000; Fernandes et al., 2002; Keller et al., 2005; Carmo et al., 2012; Bento et al., 2018; Venturini et al., 2022). Portanto, avaliamos estrategicamente os fluxos de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) nas áreas após chuvas torrenciais e durante o período mais quente do ano (Figura suplementar S7). Também experimentamos retirar 10 e 20 cm da camada superficial do solo para investigar possíveis mudanças de padrões e diferenças entre áreas,

possivelmente eliminando camadas compactadas que dificultam a infiltração de água e favorecem a produção de metano.

As avaliações foram realizadas em quatro dias consecutivos de sol, padronizando os horários exatos de incubação das câmaras ao longo do dia para as diferentes áreas. Uma medição de gás foi realizada aproximadamente 2 metros de cada ponto de amostragem de solo ($n = 5$). As dimensões da base das câmaras estáticas foram de 19,5 cm (diâmetro) \times 20 cm (altura). Essa base foi inserida 2-3 cm no solo e acoplada a uma tampa com volume de 2 L, totalizando aproximadamente 7 L de ar quando a câmara foi fechada. A tampa da câmara continha duas entradas para tubos flexíveis (6 mm de diâmetro), que foram conectados, por 10 minutos de incubação, a um analisador portátil de GEE para condições úmidas (modelo DX4015, Gasmeter Technologies, Finlândia) (Figura suplementar S8). Durante a incubação, o vácuo do analisador de gases moveu o ar da câmara em um fluxo contínuo de circulação fechada. CH_4 e CO_2 as concentrações foram medidas a cada 10 segundos, in situ e em tempo real. A saída do analisador de gás portátil forneceu os parâmetros de gás necessários para calcular o total de C- CH_4 (μg) e C- CO_2 (mg) dentro da câmara. O cálculo foi feito usando a lei dos gases ideais de Clapeyron: $pV = nRT$, que relaciona a pressão absoluta p com a temperatura absoluta T , com o volume V do recipiente contendo o gás e a quantidade n (em mols) de gás nele contido, e R é a constante molar dos gases. Em seguida, os fluxos de C- CH_4 e C- CO_2 foram quantificados pela primeira derivada relativa às concentrações e tempos, excluindo as medições dos primeiros 60 segundos de incubação da câmara para evitar qualquer viés de estabilização. Usando a extrapolação de segundo para hora e da área da câmara ($0,0266 \text{ m}^2$) para um metro quadrado, obtivemos os fluxos em $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $\text{mg C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

3.2.5. Análise de dados

A maioria das análises estatísticas foi realizada usando a plataforma R v. 4.1.2 (R Studio Team, 2022). Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram aplicados aos resultados de cada parâmetro para validar os requisitos de variância (ANOVA), homogeneidade da variância e normalidade dos erros. Quando necessário, os dados foram transformados pela técnica Box-Cox (Box; Cox, 1964). Com todos os requisitos atendidos, a ANOVA foi realizada utilizando o nível de 5% de significância para testar

a influência dos tratamentos nos atributos avaliados no estudo. Quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para verificar a correlação entre os parâmetros da MOS (C, N, H_{LIFS} , $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ e relação C:N) e atributos físicos do solo (densidade aparente, macroporosidade e microporosidade), químicos (pH, capacidade de troca catiônica [CTC], soma de bases [SB] e P disponível), e indicadores de saúde relacionados à biologia (fluxos de CO_2 e CH_4 do solo), realizamos uma análise de redundância baseada em distância (RDA) com base em matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis. A seleção direta e os testes de Monte Carlo foram aplicados com 1.000 permutações aleatórias para investigar a significância dos parâmetros da MOS como variáveis explicativas sobre os indicadores de qualidade do solo. O gráfico RDA foi gerado usando Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, Holanda) e PERMANOVA usando o software PAST v.3.0 (Hammer; Harper; Ryan, 2001).

3.3. Resultados

3.3.1. Estoques de carbono e nitrogênio

Tabela 2. Estoques de carbono (C) e nitrogênio (N) ($Mg\ ha^{-1}$) em reservatórios avaliadas acima e abaixo do solo em uma floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15).

	Reservatório	PF		R15		R8		PA	
Acima do solo	<i>Estoque de C</i>								
	Árvore	54,06 ± 1,48	a [§]	26,31 ± 3,23	b	12,29 ± 1,48	c	0 ± 0	d
	Herbáceas	0 ± 0	b	0 ± 0	b	0,55 ± 0,42	b	2,00 ± 0,24	a
Subterrâneo	Liteira	6,19 ± 0,48	a	6,40 ± 0,53	a	3,92 ± 0,79	b	2,44 ± 0,57	c
	Solo de 0-30 cm	47,44 ± 2,92	a	37,11 ± 2,96	b	38,76 ± 2,99	b	37,38 ± 3,76	b
Acima do solo	<i>Estoque de N</i>								
	Herbáceas	0 ± 0	b	0 ± 0	b	0,02 ± 0,01	b	0,06 ± 0,02	a
Subterrâneo	Liteira	0,34 ± 0,04	a	0,27 ± 0,02	ab	0,16 ± 0,04	bc	0,05 ± 0,01	c
	Solo de 0-30 cm	4,93 ± 0,23	a	3,27 ± 0,2	b	3,22 ± 0,23	b	3,62 ± 0,33	b

[§] As letras comparam os valores na linha de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança.

A floresta primária semidecídua (PF) continha os maiores estoques de C nos reservatórios acima e abaixo do solo (Tabela 2). Os estoques de N do solo na camada de 0-30 cm também foram maiores na área de PF. Plantas herbáceas, principalmente *Brachiaria decumbens*, estavam presentes na área de restauração de oito anos usando um modelo de plantio escalonado (R8). No entanto, eles estavam ausentes na área de PF, e o tratamento de restauração após 15 anos de plantio único (R15). Adicionalmente, a área de pastagem (PA) apresentou os maiores estoques de carbono nas plantas herbáceas, três vezes maior que a R8.

R15 acumulou mais C acima do solo quando comparado com R8, com estoques 2,1 e 1,6 vezes maiores para reservatórios em árvores e liteira, respectivamente. Considerando a data de amostragem, R15 e R8 acumularam uma taxa de 1,8 e 1,5 Mg C ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente, na biomassa estimada das árvores após a implementação da restauração. Adicionalmente, houve um gradiente decrescente para os estoques de C e N nas liteiras, de acordo com a seguinte ordem: PF > R15 > R8 > PA. No entanto, as áreas de restauração florestal não diferiram nos estoques de C e N do solo, apresentando valores semelhantes aos da área de pastagem (Tabela 2).

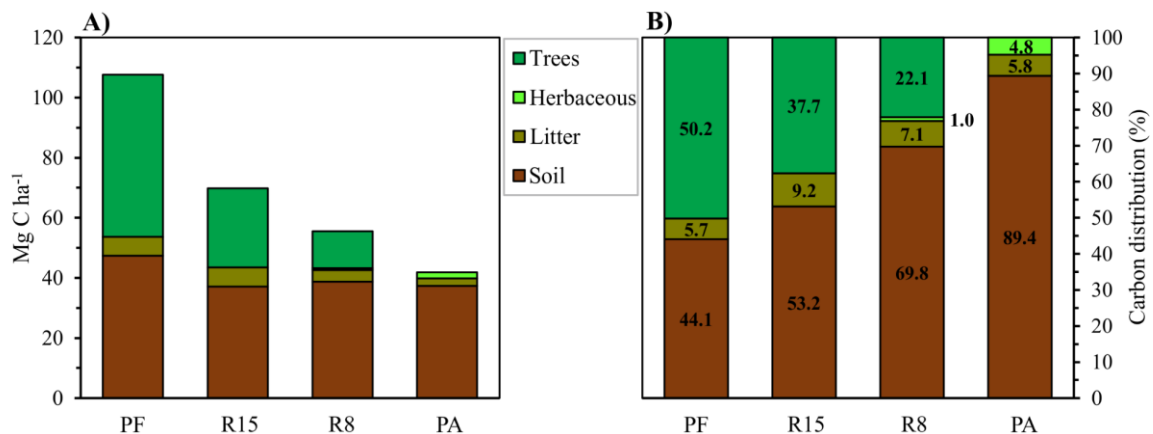


Figura 1. Acúmulo de estoque de carbono (A) e proporção (B) dos diferentes reservatórios avaliados no estudo. Floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15).

Os estoques de carbono acumulados (a soma de solo, liteira, herbáceo e reservatórios de árvores) seguiram uma ordem de gradiente: PF > R15 > R8 > PA, mostrando 108, 70, 56 e 42 Mg C ha⁻¹, respectivamente (Figura 1A). A ordem inversa foi observada para a contribuição relativa dos estoques de C do solo para a quantidade total medida de C, com 44, 53, 70 e 89% nos tratamentos PF, R15, R8 e PA, respectivamente (Figura 1B). As árvores no R8 contribuíram relativamente com 15,6% menos nos estoques acumulados acima do solo quando comparado ao R15.

3.3.2. Carbono e nitrogênio em herbácea e liteira

Tabela 3 - Teores de carbono (C) e nitrogênio (N), relação C/N e abundância dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em folhas de herbáceas e biomassa de serapilheira em áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA), e restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8) e tradicionalmente baseado em um único plantio com quinze anos (R15).

Áreas	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	C/N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<i>Herbáceas</i>					
PA	408,3 ± 6,2 a [§]	11,61 ± 0,82 b	35,78 ± 2,26 a	-14,06 ± 0,16 a	2,64 ± 0,25 a
R8	409,2 ± 11,4 a	14,92 ± 0,98 a	27,82 ± 1,63 b	-16,04 ± 0,35 b	-0,14 ± 0,32 b
<i>Liteira</i>					
PA	395,5 ± 6,5 a	7,79 ± 0,38 c	51,20 ± 2,33 a	-15,36 ± 0,58 a	2,13 ± 0,34 a
R8	398,7 ± 13,9 a	16,12 ± 1,95 b	26,30 ± 3,25 b	-28,93 ± 0,55 b	1,06 ± 0,14 b
R15	413,3 ± 6,4 a	17,45 ± 1,09 ab	24,06 ± 1,54 bc	-28,74 ± 0,32 b	2,23 ± 0,78 a
PF	392,0 ± 15,3 a	21,60 ± 1,48 a	18,40 ± 1,06 c	-28,85 ± 0,41 b	0,96 ± 0,39 b

[§] As letras comparam os tratamentos para cada reservatório na coluna de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança.

Os teores de C em reservatório herbáceo não diferiram entre PA e R8 (Tabela 3). No entanto, os teores de N herbáceo foram maiores nesta área de restauração, reduzindo a relação C/N em oito unidades. Embora a maioria das plantas herbáceas em R8 fosse *B. decumbens*, sua menor abundância isotópica do que no PA (em torno de -2 e -3‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente) indica algumas tênues misturas de plantas C₃ no material C₄.

Os teores de C da biomassa da serapilheira foram semelhantes entre os tratamentos. Por outro lado, observou-se um gradiente crescente nos teores de N do PA para as restaurações florestais e para a mata nativa, com 7,8, 16,1 a 17,4 e 21,6 g kg⁻¹, respectivamente. A serapilheira nas áreas de restauração florestal (R8 e R15) provavelmente teve origem em plantas C₃, pois o $\delta^{13}\text{C}$ variou de 28,7 a 28,9‰. Esses valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram semelhantes aos da mata nativa ($\delta^{13}\text{C} = 28,9\text{‰}$). Na serapilheira, $\delta^{15}\text{N}$ foi maior nas áreas PA e R15, enquanto as menores abundâncias (diferença de -1‰) foram encontradas nas áreas PF e R8 (Tabela 3).

3.3.3. Teor de carbono e nitrogênio do solo

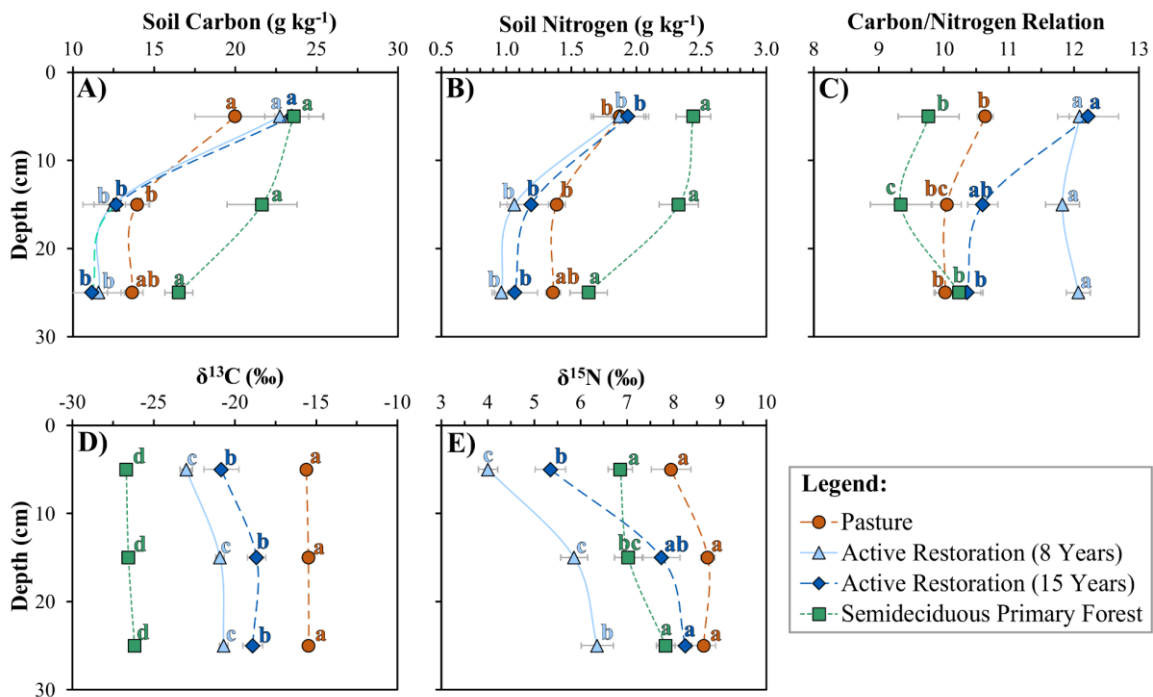


Figura 2. Teores de carbono (A) e nitrogênio (B) do solo, relação C/N (C) e abundância dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) (D) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) (E) em floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15). As letras comparam os tratamentos para cada profundidade de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança.

Os teores de C no solo não diferiram entre os tratamentos na camada superior do solo avaliada (Figura 2A). No entanto, a mata nativa apresentou os maiores teores de C nas camadas mais profundas do solo, pelo menos 1,2 e 1,5 vezes maior que a

pastagem e as duas áreas de restauração, respectivamente. $\delta^{13}\text{C}$ em solo de floresta nativa variou de -26,2 a -26,7‰, o que é característico em solos sob plantas C_3 .

Em contraste, na área de pastagem variou de 15,5 a 15,6‰, predominantemente resultante de aportes de matéria orgânica de gramíneas C_4 (Figura 2D). Um resultado inesperado foi a diminuição do $\delta^{13}\text{C}$ do solo na área de restauração mais jovem (R8) em comparação com a mais antiga (R15) em todas as camadas do solo, mostrando sinais isotópicos de C mais próximos aos da área de floresta nativa. Diante desses resultados, o modelo de restauração parece desempenhar um papel essencial na mudança da dinâmica da ciclagem e da origem da matéria orgânica do solo.

Os teores de N no solo foram pelo menos 21, 40 e 17% maiores (0-10, 10-20 e 20-30 cm de camadas de solo, respectivamente) na floresta semidecídua nativa do que nos outros tratamentos (Figura 2B). Não houve diferenças entre os teores de N no solo das duas áreas de restauração florestal e pastagem nas camadas de solo de 0-10 e 10-20 cm. Por outro lado, na camada mais profunda do solo, a pastagem apresentou teores intermediários de N, não diferindo tanto das restaurações florestais quanto da mata nativa. O N foi maior na pastagem em todas as camadas do solo, onde o $\delta^{15}\text{N}$ variou de 7,9 a 8,7‰ (Figura 2E). As menores abundâncias de ^{15}N ocorreram no solo da área R8, variando de 4,0 a 6,4‰. PF e R15 apresentaram valores intermediários de $\delta^{15}\text{N}$ nas camadas de 10-20 e 20-30 cm do solo, enquanto na camada superficial o $\delta^{15}\text{N}$ da área de PF não foi estatisticamente diferente da área de pastagem. Além disso, as áreas de restauração florestal apresentaram maior relação C:N do que a floresta nativa (Figura 2C), provavelmente refletindo a disponibilidade de serapilheira, que também continha maior relação C:N sob restauração (Tabela 3). Mesmo que a pastagem tenha apresentado a maior relação C:N em sua biomassa (Tabela 3), o C:N do solo foi intermediário entre as áreas de restauração e mata nativa, provavelmente relacionado à herbivoria frequente e às mudanças diretas na ciclagem do N.

3.3.4. Proporção de carbono C₄ e C₃ das plantas

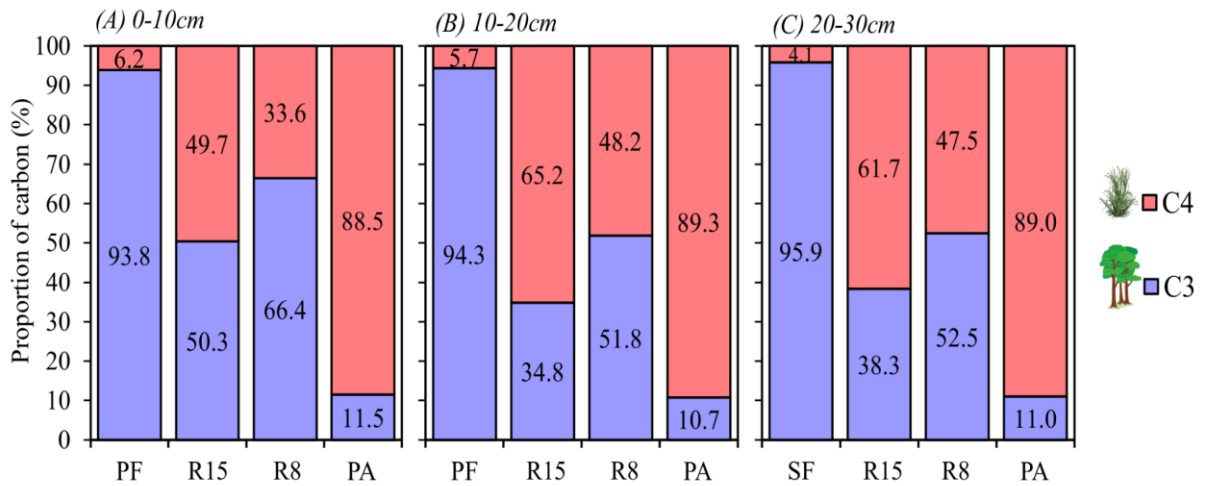


Figura 3. Proporção de carbono de plantas C₃ e C₄ no solo (camadas 0-10, 10-20 e 20-30 cm) sob os tratamentos avaliados no estudo. Floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15).

A mata nativa mostrou que pelo menos 93% de sua MOS se originou de plantas C₃ quando consideradas as três camadas de solo avaliadas (Figura 3). Por outro lado, o solo da pastagem foi composto por pelo menos 88% da MOS derivada de gramíneas (plantas C₄). O R8 apresentou MOS vindas das árvores variando de 51,8 a 66,4% entre as camadas do solo, com maior participação quando comparado ao R15, variando de 38,3% a 50,3%. A proporção de MOS derivada de C₃ reduziu do solo superficial para a camada mais profunda, 12% e 14% em R15 e R8, respectivamente.

3.3.5. Índice de humificação da matéria orgânica do solo

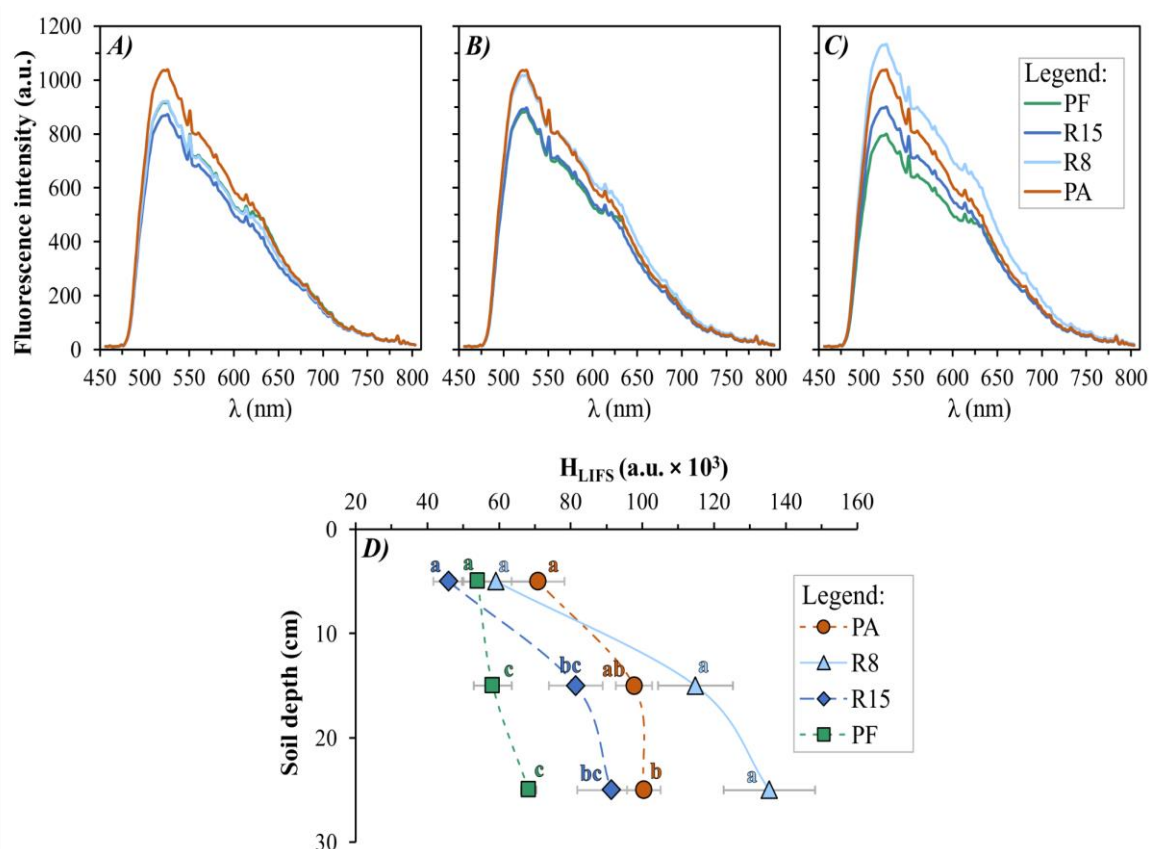


Figura 4. Espectros médios de fluorescência induzida por laser (LIFS) em camadas de solo de 0-10 cm (A), 10-20 cm (B) e 20-30 cm (C) e índice de humificação da matéria orgânica do solo (H_{LIFS}) em 0-10, 10-20 e 20-30 cm de camadas de solo (D) sob os tratamentos avaliados no estudo. As letras comparam os tratamentos para cada profundidade de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança. Floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15).

Os espectros de emissão de fluorescência (Figura 4) de todo o solo dos sítios PA, R8, R15 e PF mostram uma banda larga com intensidade máxima em torno de 525 nm com picos distintos entre 550 nm, 580 nm e 620 nm para todos os tratamentos avaliados. Picos distintos em comprimentos de onda espectrais mais longos, regiões entre 550 – 580 nm, sugerem a presença de estruturas aromáticas na MOS. Além disso, a mudança na fluorescência para comprimentos de onda mais longos induz uma maior concentração de cadeias aromáticas altamente condensadas (Tadini et al., 2021; 2015; Tivet et al., 2013), especialmente com um ressalto em torno de 620 nm na camada mais profunda do solo avaliada (20-30 cm) (Figura 4C). Ao comparar o padrão espectral entre os tratamentos, os picos na pastagem foram consistentemente

maiores do que na floresta semidecídua para todas as camadas do solo (Figura 4A, 4B e 4C). No entanto, enquanto as áreas de restauração florestal mostraram espectros muito mais próximos à floresta nativa na camada superficial do solo (Figura 4A), a intensidade da emissão aumentou com a profundidade do solo em R8 e R15. Na camada de solo de 20-30 cm, os picos de emissão das áreas em restauração foram maiores do que na mata nativa, sugerindo que elas contêm maior predominância de MOS aromática.

O índice de humificação da MOS (H_{LIFS}) mostrou semelhanças entre os tratamentos na camada superficial do solo (Figura 4D). Em termos gerais, as principais observações para valores de H_{LIFS} foram: (i) a floresta nativa apresentou valores constantes nas profundidade do solo, inferior a áreas antropizadas em camadas mais profundas do solo, sugerindo estabilidade química da MOS juntamente com o perfil do solo e maior aporte de compostos orgânicos metabolizáveis com menor taxa de oxidação (Bayer et al., 2006); (ii) H_{LIFS} nas camadas mais profundas do solo (10-20 e 20-30cm) foram maiores em R8 com os índices mais distantes da mata nativa, sugerindo um desequilíbrio nas frações da MOS com predominância de maior grau de aromaticidade e complexidade de compostos humificados (Tivet et al., 2013); e (iii) nas camadas de solo de 10-20 e 20-30 cm observou-se a seguinte ordem decrescente para os valores médios de H_{LIFS} : R8 > PA > R15 > PF.

3.3.6. Relação entre frações da MOS e propriedades químicas, físicas e biológicas do solo

As análises RDA e a PERMANOVA bidirecional mostraram que os tratamentos ($F = 19,4$, $P < 0,0001$) e as camadas do solo ($F = 29,8$, $P < 0,001$) eram marcadamente diferentes (Figura 5A). RDA1 explicou a variação mais significativa (67,8%), enquanto RDA2 explicou 0,08%. As amostras tendem a se agrupar de acordo com os sistemas de uso da terra (tratamentos), onde PF e PA foram distintamente colocados em grupos separados. As áreas de restauração florestal (R8 e R15) apresentaram semelhanças, e alguns pontos cruzaram com a PF. As variáveis explicativas foram responsáveis por 69,13% da variação total.

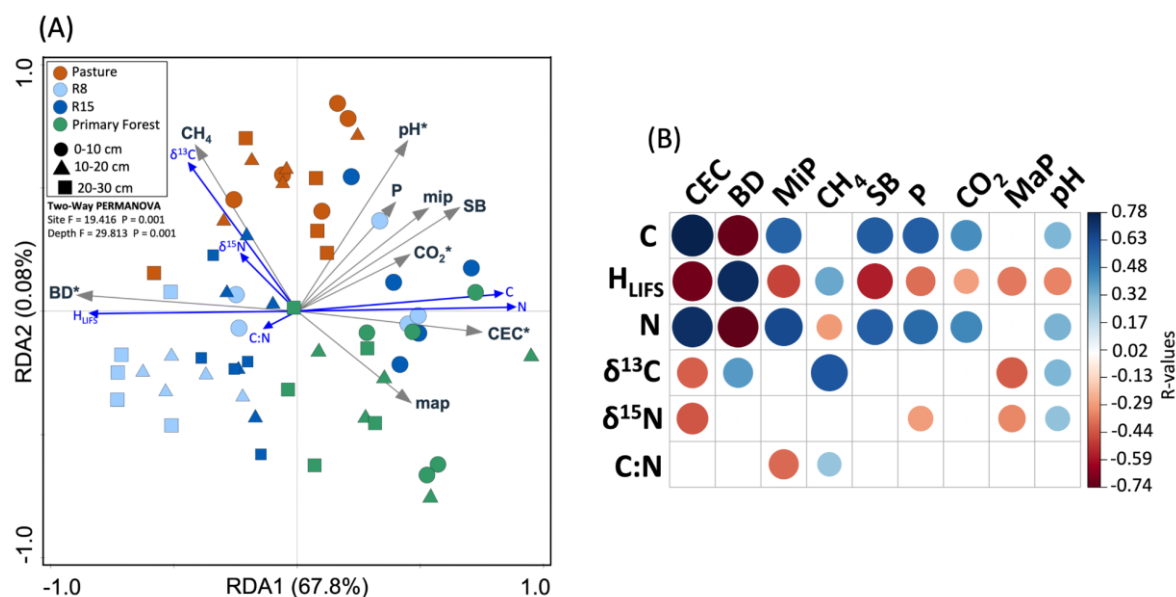


Figura 5. Análise de redundância (RDA) dos parâmetros da matéria orgânica do solo e propriedades químicas, físicas e biológicas do solo relacionadas (A). O mapa de calor mostra as correlações de Spearman entre os parâmetros usados no RDA (B). As setas indicam a correlação entre as propriedades de saúde do solo selecionadas (químicas, físicas e biológicas) e os parâmetros da matéria orgânica do solo. A significância dessas correlações foi avaliada por meio do teste de permutação de Monte Carlo e é indicada por um asterisco ($P < 0,05$). A análise de permutação (PERMANOVA) é indicada no canto superior esquerdo da RDA. C: carbono total do solo, H_{LIFS}: índice de humificação da matéria orgânica do solo, N: nitrogênio total do solo, δ¹⁵N: abundância natural de ¹⁵N no solo, δ¹³C: abundância natural de ¹³C, pH: o potencial de hidrogênio na água; CTC: capacidade potencial de troca catiônica do solo, SB: soma de bases no solo, P: teor de fósforo disponível no solo, Ds: densidade aparente do solo, MaP: macroporosidade do solo, MiP: microporosidade do solo, CO₂: fluxo de dióxido de carbono do solo, CH₄: fluxo de metano do solo. Floresta semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa usando plantio escalonado com oito anos (R8), restauração ativa baseada em uma plantação tradicional com quinze anos (R15).

Usando as correlações de Spearman, também investigamos a relação entre os parâmetros da MOS com outros indicadores de saúde do solo. As correlações significativas ($p < 0,05$) são mostradas por um mapa de calor (Figura 5B). C e N do solo correlacionaram-se positivamente ($r > 0,5$) com CTC, SB e microporosidade do solo e negativamente com a densidade do solo ($r \sim -0,7$) e emissões de CH₄ ($r \sim -0,3$). C, N, macroporosidade e CTC foram mais associados à área de PF (Figura 5A). Por outro lado, H_{LIFS} foi negativamente correlacionada com a CTC do solo ($r = -0,71$), SB ($r = -0,56$), P ($r = -0,39$), e microporosidade ($r = -0,48$), enquanto positivamente correlacionado com a densidade do solo ($r = 0,75$) e emissões de CH₄ ($r = 0,36$). Na

Figura 5A, podemos ver que o H_{LIFS} também apresentou setas opostas para os teores de C e N do solo e uma associação positiva com maiores valores de densidade do solo e foi mais associado às áreas de pastagem e R8.

Outros parâmetros da MOS apresentaram correlações mais baixas com as variáveis de resposta à saúde do solo. Por exemplo, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram negativamente correlacionados com CTC do solo ($r \sim -0,4$) e macroporosidade ($r \sim -0,3$). As emissões de CO_2 apresentaram relação positiva com C ($r = 0,42$) e N ($r = 0,44$) do solo. Finalmente, as emissões de CH_4 foram correlacionadas positivamente com $\delta^{13}\text{C}$ ($r = 0,61$) e H_{LIFS} ($r = 0,34$) e negativamente com teores totais de C ($r = -0,22$) e N ($r = -0,29$) no solo.

3.3.7. Fluxos de metano e dióxido de carbono

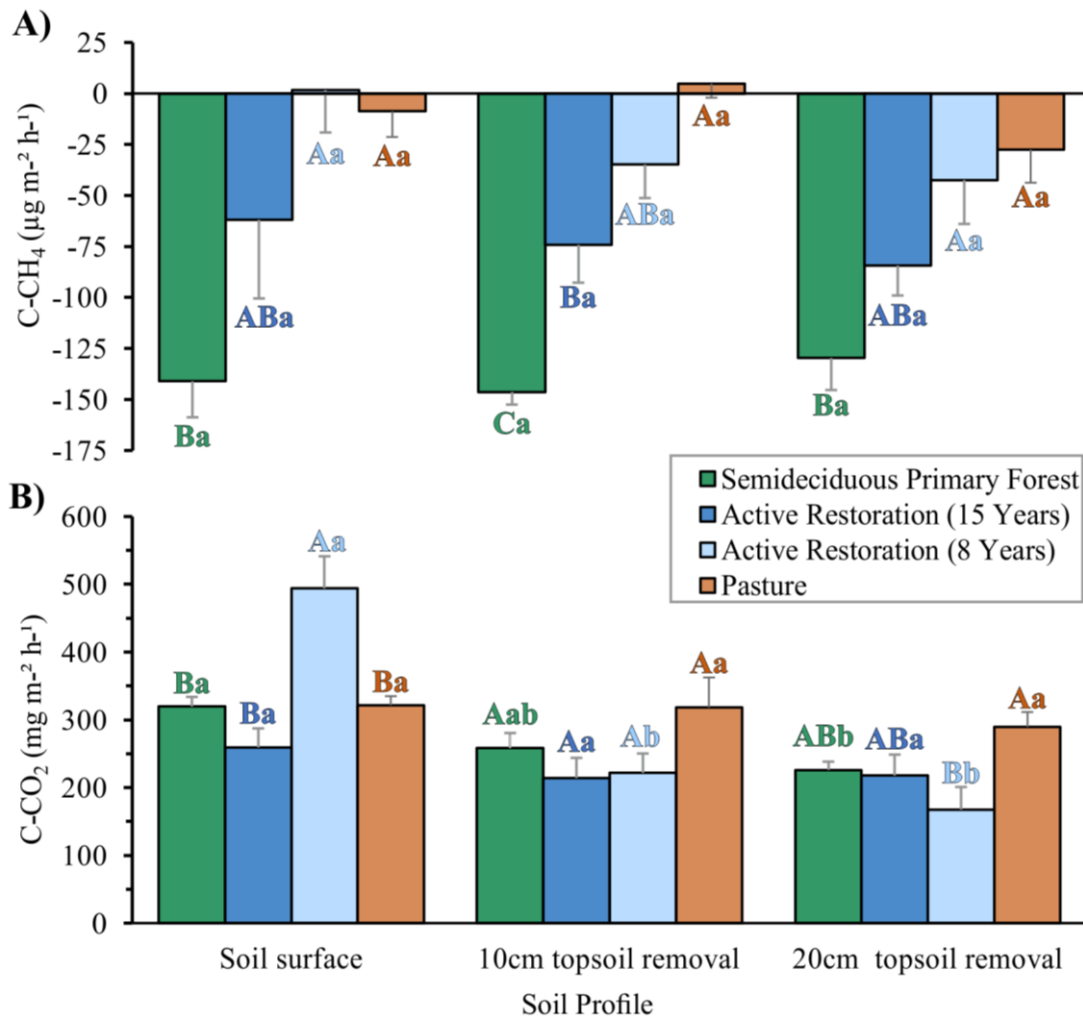


Figura 6. Fluxos de metano (A) e dióxido de carbono (B) na superfície do solo e com remoção de solo superficial de 10 cm e 20 cm em florestas nativas semidecíduas, pastagens e áreas de restauração florestal. As letras maiúsculas comparam os tratamentos para cada profundidade e as letras minúsculas comparam as profundidades de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança.

Fluxos de metano (CH_4) mostraram o mesmo padrão quando medidos na superfície do solo e após 10 e 20 cm de remoção do solo superficial (Figura 6A). Na superfície do solo, o solo de mata nativa apresentou o maior consumo de C- CH_4 ($-141,1 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$), seguido da área de restauração mais antiga (R15), com $-61,9 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$. No pasto, o consumo de C- CH_4 foi menor ($-8,8 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$), e no R8, houve uma pequena produção ($1,7 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Ao remover 20 cm do solo, as áreas de pastagem e R8 consumiram cerca de 28 e $42 \mu\text{g C-CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente.

As emissões de dióxido de carbono (CO_2) foram pelo menos 30% maiores no R8 quando comparadas aos outros tratamentos na superfície do solo, mas foram reduzidas em mais da metade com a remoção do solo superficial (Figura 6B). A área de pastagem não apresentou alterações nos fluxos de C- CO_2 ao retirar o solo e produziu mais CO_2 nas camadas mais profundas quando comparada às demais áreas. Enquanto isso, as emissões de CO_2 nas áreas florestais e R8 diminuíram com a remoção do solo.

3.4. Discussão

3.4.1. Sequestro de carbono e nitrogênio

Os resultados revelam uma quantidade significativa de C bloqueado nas camadas acima do solo (ou seja, árvores, herbáceas e de serapilheira), mas também que o C do solo foi restaurado em mais de 78% considerando os níveis de floresta primária, corroborando com resultados anteriores (por exemplo, Brancalion et al., 2021; Zanini et al., 2021; Korys et al., 2021; Poorter et al., 2021). Recuperar C em solos sob proteção de cobertura florestal é estratégico para combater o aquecimento global, pois pode permanecer armazenado por anos, décadas ou mesmo séculos (Lavalle et al., 2020). No entanto, esses resultados mostram que áreas jovens de restauração ecológica (8 e 15 anos após a implementação) não atingiram os níveis de estoque de C e N acima e abaixo do solo da floresta primária madura. Em vez disso, os estoques de C acima e abaixo do solo da floresta primária foram pelo menos 28 e 18% maiores do que os outros tratamentos. Isso destaca o quão crítico é preservar os fragmentos de florestas nativas, pois eles alcançaram sua estabilidade potencial ao longo da evolução de milhares e até milhões de anos (FAO; UNEP, 2020). Além disso, os fragmentos de floresta primária permanecem como ilhas de biodiversidade insubstituível, fonte de sementes de espécies nativas e suas dispersoras. Elas são

imprescindíveis para a conectividade dos corredores ecológicos (Matos et al., 2020) e para garantir a restauração ecológica duradoura da Mata Atlântica (Rosa et al., 2021).

Mesmo com diferença na idade de implantação, os estoques de C ($37,1 \text{ Mg C ha}^{-1}$) e N ($3,3 \text{ Mg N ha}^{-1}$) do solo na restauração de 15 anos (R15) não diferiram dos de 8 anos (R8) ($38,8 \text{ Mg C ha}^{-1}$ e $3,2 \text{ Mg N ha}^{-1}$). No entanto, o C das árvores e da serapilheira foi mais de 60% maior em R15, que acumulou C acima do solo a uma taxa média de $1,8 \text{ Mg C ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ($0,3 \text{ Mg C ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ a mais que R8). Portanto, enquanto os estoques de C acima do solo responderam diretamente à idade da floresta, os estoques de C no solo não seguiram a mesma tendência. No mesmo contexto, Brancalion et al. (2021) analisaram o sequestro de C em 30 florestas secundárias. Eles mostraram que enquanto o C da vegetação respondia à idade da floresta, o C do solo dependia mais dos nutrientes do solo, textura e variabilidade da paisagem. No entanto, neste estudo, o solo R15 apresentou o mesmo ou até melhor nível de atributos químicos (Tabela 1) e estava mais próximo do fragmento de floresta primária (Figura 1). Portanto, para este experimento, a velocidade de acúmulo de C no solo provavelmente esteve relacionada a mudanças no manejo da restauração florestal, ou seja, no modelo aplicado. Por exemplo, plantas de adubo verde como *Crotalaria* sp. fixam N atmosférico no solo e beneficiam a atividade biológica do solo (Araújo Neto et al., 2014), desempenhando um papel essencial na incorporação de C ao solo (Ros; Hernandez; García, 2003), melhorando o acúmulo de C no solo (Mayer et al., 2020).

A área de pastagem reformada apresentou estoques de C no solo no mesmo nível das áreas de restauração florestal. De fato, pastagens bem manejadas podem acumular quantidades significativas de C nas camadas superiores do solo, às vezes apresentando estoques de C iguais ou até maiores que as florestas (Guo; Gifford, 2002; Segnini et al., 2019). Os principais fatores que favorecem o armazenamento de C no solo sob pastagens bem manejadas são: (i) a taxa de lotação animal adequada em pastejo rotacionado, dinamizando a reciclagem de nutrientes (Bieluczyk et al., 2020); e (ii) o sistema radicular profundo, abundante e bem distribuído das gramíneas pastadas, injetando constantemente C no crescimento e renovação das raízes (Bieluczyk et al., 2021). Por outro lado, o agroecossistema de pastagem armazenou apenas 11% de seu C ($4,4 \text{ Mg C ha}^{-1}$) em reservas acima do solo. Ao mesmo tempo, a restauração escalonada de oito anos acumulou $16,8 \text{ Mg C ha}^{-1}$, e a restauração florestal tradicional de 15 anos apresentou $32,7 \text{ Mg C ha}^{-1}$. Além disso, ao somar os

reservatórios de C acima e abaixo do solo, as restaurações florestais de oito e 15 anos acumularam 14 e 28 Mg C ha⁻¹, respectivamente, mais do que o pasto reformado. Com essas informações, podemos afirmar que o sequestro de C foi maior na restauração florestal do que na pastagem reformada (Figura 1). Portanto, isso indica que restaurar a Mata Atlântica ainda é a melhor opção para mitigar as emissões de GEE em terras anteriormente severamente degradadas.

3.4.2. Quantidade, qualidade e origem da matéria orgânica do solo

Os reservatórios herbáceos e de serapilheira, como possíveis aportes de matéria orgânica ao solo, diferiram entre os tratamentos quanto aos teores de N, relação C:N, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 3). Enquanto a serapilheira da floresta primária forneceu os maiores teores de N, a serapilheira da pastagem apresentou os menores. O N na serapilheira do pasto não atingiu nem a metade do conteúdo sob cobertura florestal. Além disso, a biomassa herbácea e serapilheira na pastagem apresentou $\delta^{13}\text{C}$ típico de gramíneas C₄, variando de -14,06 a -15,36‰, enquanto a serapilheira sob mata primária e restaurações apresentaram $\delta^{13}\text{C}$ variando de -28,74 a -28,93‰, típico de plantas arbóreas C₃. O sinal isotópico representa a impressão digital das fontes de matéria orgânica do solo: plantas C₃ apresentam composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de -24 a -34‰, enquanto para plantas C₄, o $\delta^{13}\text{C}$ varia de -9 a -15‰ (Martinelli et al., 2009; Smith; Epstein, 1971). Dadas essas características, as diferenças dos sistemas no papel de armazenamento de C começaram com as fontes de biomassa acima do solo, que posteriormente se refletiram nas propriedades da matéria orgânica do solo.

Os efeitos da restauração florestal foram mais efetivos na camada superficial do solo (0-10 cm), onde os teores de C das restaurações de 8 e 15 anos atingiram os valores da floresta primária (Figura 2A). Além disso, as restaurações mostraram pelo menos 15% mais C derivado de plantas C₃ (árvores ou adubo verde) na camada superficial do solo do que no solo mais profundo (Figura 3). Portanto, ambos os locais de restauração florestal seguem uma intensidade de efeito de cima para baixo no perfil do solo na recuperação das quantidades de MOS. Nesse contexto, é bem conhecido que a agricultura diminui o C e o N do solo primeiramente na camada superficial do solo (Mayer et al., 2020). No entanto, estudos também mostraram que as propriedades do solo das camadas rasas são recuperadas principalmente pela vegetação florestal em restauração (Don et al., 2011) devido à deposição de

serapilheira e maior concentração de raízes, favorecendo a atividade biológica e a incorporação de matéria orgânica no solo superior (Medeiros et al., 2020).

A origem da MOS foi investigada através da abundância do isótopo ^{13}C da MOS ($\delta^{13}\text{C}$). Em nossas áreas de restauração, quando $\delta^{13}\text{C}$ mais alto foi encontrado, isso indicou que a fonte primária de C acumulada no solo ainda era derivada do pasto anterior. Por outro lado, quando $\delta^{13}\text{C}$ foi rebaixado (valores mais negativos), foi um indício de que a restauração estava sequestrando C, sugerindo que o ambiente edáfico está evoluindo para uma floresta (Zanini et al., 2021). A floresta primária apresentou mais de 93% do C do solo proveniente de plantas C_3 , enquanto na pastagem, mais de 89% do C do solo foi proveniente de plantas C_4 (gramíneas). Inesperadamente, a restauração de oito anos apresentou 14,2 a 17,0% a mais de C das plantas C_3 do que a restauração de 15 anos, dependendo da camada do solo (Figura 3). O modelo escalonado (restauração de 8 anos de idade) possivelmente favoreceu maior MOS derivada de plantas C_3 devido a um conjunto de razões: (i) maior entrada de C no solo do consórcio de árvores de crescimento rápido e plantas de adubo verde; (ii) fixação adicional de N por plantas de adubo verde (conforme indicado por menor $\delta^{15}\text{N}$ e maior abundância do gene *nifH* [Figura suplementar S9] nesta área) e acúmulo de C no solo (Mayer et al., 2020); (iii) melhor controle de gramíneas invasoras (Rodrigues et al., 2009), reduzindo assim a entrada de carbono C_4 no solo; e (iv) maiores perdas de C em pastagem degradada antes da restauração, de 2006 a 2013, quando a área de 15 anos de restauração já estava sendo recuperada. Aqui devemos destacar que as gramíneas exóticas invasoras têm sido um problema persistente na restauração de florestas porque suprimem a germinação de espécies nativas em regeneração (Weidlich et al., 2020). Os bancos de sementes dessas gramíneas entram em dormência e podem germinar ao longo de décadas (Sorreano, 2002). Elas germinam quando estimuladas pela luz solar, que atravessa as copas nos estágios iniciais de restauração, e durante as estações secas, quando as árvores semidecíduas perdem uma quantidade significativa de folhas (Bianchini; Pimenta; Santos, 2001). Portanto, gramíneas exóticas do sub-bosque tendem a coexistir nas áreas de restauração florestal. No entanto, eles podem ser bem suprimidos pelo rápido crescimento da biomassa abundante de adubo verde (Rodrigues et al., 2009; Brancalion; Gandolfi; Rodrigues, 2015), como foi realizado na área de restauração de 8 anos.

As propriedades de qualidade da MOS começaram a ser moldadas acima do solo com as diferentes fontes de MO nos sistemas. No entanto, usando o espectro de fluorescência induzida por laser, pudemos investigar a estabilidade química da MOS e o índice de humificação (H_{LIFS}), portanto, as propriedades de qualidade da MOS. O resultado mais evidente para o LIFS foi o aumento dos picos de emissão de fluorescência em comprimentos de onda mais longos para as camadas mais profundas do solo das áreas manejadas (restauração e pastagem), mas não na floresta primária (Figura 4). Outra observação foi que, enquanto os picos no pasto eram consistentemente mais altos do que na floresta primária na camada superficial do solo, as áreas de restauração florestal apresentavam espectros proximais à floresta primária. Esses ressaltos mais acentuados em comprimentos de onda mais longos refletem cadeias aromáticas condensadas de MOS, anteriormente mostradas como mais altas em pastagens, especialmente em camadas mais profundas do solo (Tadini et al., 2021; 2022a; 2022b). Nesses estudos, os autores mostraram que pastagens bem manejadas podem acumular uma quantidade significativa de MOS quimicamente estável em camadas profundas do solo.

Tadini et al. (2021) encontraram correlações negativas de H_{LIFS} com CTC e com conteúdo de C, também foi verificado esse padrão (Figura 5). Portanto, a maior predominância de MOS humificada transformada não necessariamente melhora a saúde química e física do solo. O H_{LIFS} consiste em um equilíbrio entre as frações do MOS porque é obtido dividindo o LIFS pela quantidade de C (%) (Milori et al., 2006) e precisa ser interpretado com cautela. Por exemplo, suponha que o H_{LIFS} do sistema manejado seja maior do que o da floresta primária local, que é uma referência de ecossistema edáfico funcionalmente estável (Teixeira et al., 2020), isso indica uma transformação mais acelerada da MOS ou mesmo uma menor adição de material orgânico recente. Portanto, o sistema manejado apresenta um desequilíbrio entre as frações da MOS com menor presença de compostos orgânicos metabolizáveis (Bayer et al., 2006), fundamentais para a atividade biológica e ciclagem de nutrientes (Kravchenko et al., 2019). Diante disso, a mensagem com base nestes resultados é que a recuperação de pastagens e a restauração ativa de florestas (com nosso período pós-implementação avaliado) restaurou totalmente o equilíbrio das frações da MOS apenas para a camada superficial do solo (Figura 4D). Isso porque não houve diferença em seus H_{LIFS} em comparação com a floresta nativa primária nesta camada de solo. Por outro lado, para as camadas mais profundas do solo de 10-20 e 20-30

cm, as áreas manejadas ainda não restauraram esse equilíbrio, principalmente a área de restauração mais jovem, com 8 anos de idade, que estava mais distante da floresta primária. Os valores de H_{LIFS} em 10-30 cm seguiram a ordem: R8 > PA > R15 > PF, sugerindo que áreas de pastagem e restauração ainda precisam melhorar a matéria orgânica lábil no solo.

3.4.3. Relações entre frações de matéria orgânica do solo e saúde do solo

A análise RDA reuniu as amostras de pastagem e floresta primária em grupos separados (Figura 5A) porque a pastagem foi relacionada a maiores emissões de $\delta^{13}C$ (C de plantas C_4) e CH_4 (ou menor consumo), enquanto a floresta primária se correlacionou a maiores C, N, CTC e macroporosidade (Figura 5A). Essas descobertas são consistentes com muitas outras na literatura (por exemplo, Steudler et al., 1996; Lal, 2005; Cherubin et al., 2016; Pedrinho et al., 2019; Bieluczyk et al., 2020) que mostraram que a conversão de florestas em pastagens altera as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Este conjunto de estudos fornece uma compreensão clara de que os solos florestais não perturbados pelo homem tiveram muito tempo para “construir” uma estrutura de solo resiliente que protege e acumula MOS, fornecendo CTC fundamental em solos tropicais intemperizados. Além disso, a MOS suporta múltiplos processos ecossistêmicos e é considerada o principal indicador da saúde do solo (Mendes et al., 2019).

Comparada à floresta primária, a pastagem manejada apresentou uma CTC reduzida (Tabela 1; Figura 5A), principalmente devido ao seu menor teor de MOS, uma vez que o C do solo foi significativamente correlacionado com a CTC ($r = 0,78$). Ao mesmo tempo, a pastagem aumentou o pH do solo e a disponibilidade de nutrientes devido à calagem e à adubação. Além disso, as pastagens normalmente têm densidades do solo mais altas do que as florestas por causa do pisoteio animal (Pedrinho et al., 2019; Bieluczyk et al., 2020), o que não é diferente dos dados estudados, pois o solo da pastagem apresentou uma densidade do solo 13% maior do que a floresta. Além disso, a maior emissão (ou menor influxo) de CH_4 do solo na pastagem pode estar relacionada a uma maior amplitude de temperatura e umidade do solo (Fernandes et al., 2002; Carmo et al., 2012). Os resultados também sugeriram esse padrão, pois as temperaturas do ar e do solo durante a amostragem de gás (no exato momento do dia) foram, em média, 16 e 6 °C mais altas no pasto do que na floresta primária (Figura suplementar S11). Além disso, como o solo da pastagem foi

mais compactado por causa do pastejo, pode ter limitado a difusão de oxigênio, criando condições adequadas para a decomposição anaeróbica metanogênica da MOS (Stuedler et al., 1996), também evidenciado em neste estudo pela maior abundância de *mcrA* para a pastagem (Figura suplementar S10). A maior abundância de *mcrA* do solo em pastagens em comparação com florestas foi recentemente revelada por vários estudos no bioma Amazônia (por exemplo, Meyer et al., 2017; 2020; Kroeger et al., 2021; Venturini et al., 2022) e parece seguir o mesmo padrão para o bioma Mata Atlântica.

A RDA não separou em grupos específicos as duas restaurações florestais, demonstrando que essas áreas apresentaram similaridades para os atributos avaliados. Além disso, ambas as restaurações foram posicionadas entre a floresta primária e a pastagem, com alguns pontos da camada superficial do solo permeando o aglomerado de floresta primária. Portanto, ambas as restaurações estão em um estágio intermediário entre pastagem e floresta primária, indicando uma reabilitação progressiva da saúde do solo semelhante à floresta e das propriedades da MOS. Com base na RDA e nas correlações, as principais mudanças que ainda devem ocorrer nas restaurações para a saúde do solo da floresta, principalmente nas camadas de 10-20 e 20-30 cm, são as seguintes: (i) recuperar a estrutura do solo para reduzir a densidade do solo e aumentar a macroporosidade; e (ii) aumentar a MOS lábil para reduzir H_{LIFS} e ganhar CTC. A maximização da adição e acumulação de MOS pode ser uma ferramenta eficiente para ajudar a resolver essas limitações existentes, uma vez que o C do solo foi fortemente correlacionado negativamente com a densidade do solo ($r = -0,73$) e positivamente com a CTC ($r = 0,78$). Portanto, fornecer quantidade e diversidade de compostos orgânicos para retorno de curto, médio e longo prazo na restauração florestal pode beneficiar a saúde do solo e o funcionamento do ecossistema, pois as propriedades da MOS explicaram 69% da variação total da saúde do solo, considerando indicadores químicos, físicos e biológicos.

3.4.4. Mitigação de emissões de gases de efeito estufa

Em todos os perfis de solo avaliados, a força potencial do influxo de C-CH₄ seguiu a seguinte ordem: floresta primária > restauração de 15 anos > restauração de 8 anos > pastagem. Alguns estudos mostraram que florestas tropicais de terras altas não perturbadas servem como sumidouros substanciais e sazonalmente persistentes

de CH₄ (Fernandes et al., 2002; Zhao et al., 2019; Siqueira-Neto et al., 2021; Mombrini et al., 2022). Os resultados são consistentes com esses autores, pois mostramos que a floresta primária capturou mais que o dobro do metano (medição da superfície do solo) em comparação com os outros tratamentos. Esse consumo significativo está relacionado aos metanotróficos do solo, evidenciado em nosso estudo pela abundância do gene *pmoA*, que foi pelo menos 30% maior na camada superior do solo da floresta primária (Figura suplementar S10). No entanto, as áreas de restauração também estão oxidando C-CH₄ no solo, com destaque para a restauração de 15 anos (-61,9 µg m⁻² h⁻¹). Menor potencial foi observado na pastagem bem manejada (-8,8 µg m⁻² h). Embora corroboram com os resultados de estudos que mostraram que as florestas secundárias gradualmente trazem de volta a força do influxo de CH₄ do solo (por exemplo, Kroeger et al., 2021; Meyer et al., 2020), o consumo de CH₄ em pastagens bem manejadas na Mata Atlântica também foi evidenciado recentemente, com diminuição entre -1,82 e -0,87 kg C-CH₄ ha⁻¹ ano⁻¹ (Amadori et al., 2022). Por outro lado, solos de pastagem também emitiram quantidades significativas de CH₄ (por exemplo, Fernandes et al., 2002; Meyer et al., 2020), principalmente por causa da maior atividade metanogênica do solo (Kroeger et al., 2021; Venturini et al., 2022). Diante desse contraste, nota-se que o manejo da pastagem é decisivo para o papel da área nos fluxos de CH₄. Pastagens não manejadas ou sobre pastoreadas degradam o solo, que atua como fonte de CH₄, enquanto pastagens conduzidas sob princípios de conservação reduzem as emissões ou até mesmo diminuem o CH₄ no solo.

A emissão de CO₂ está associada à decomposição e oxidação da MOS, à atividade de microrganismos heterotróficos e à respiração das raízes das plantas, modelada simultaneamente pelas condições ambientais do solo, como temperatura, umidade, oxigênio e disponibilidade de nutrientes (Wang et al., 2019; Siqueira-Neto et al., 2021). Por exemplo, uma meta-análise global recente de 101 estudos mostrou que a conversão de florestas primárias para outros usos da terra diminuiu os efluxos de C-CO₂ do solo, uma consequência direta da redução da biomassa microbiana do solo e da respiração através da mudança no uso da terra (Han; Zhu, 2020). Não foram encontradas diferenças entre florestas primárias, pastagens e áreas de restauração de 15 anos para emissões de C-CO₂ na superfície do solo, exceto para efluxos 30% maiores na restauração de 8 anos. O aumento das emissões de C-CO₂ tem sido usado como produtividade do ecossistema e indicadores de alocação de carbono abaixo do

solo (Raich; Nadelhoffer 1989; Salimon et al., 2004), uma vez que refletem a atividade biológica total no solo (Carmo et al., 2012). Nesse contexto, foram encontradas correlações positivas do efluxo de C-CO₂ com o C do solo ($r = 0,42$) e N ($r = 0,44$) e a disponibilidade de nutrientes (Figura 5B). No entanto, o maior C-CO₂ na restauração de oito anos e principalmente no perfil do solo da pastagem também pode estar relacionado às suas temperaturas mais altas do ar e do solo (Figura suplementar S11). Aumento da temperatura do ar e do solo com umidade disponível suficiente no solo (como foi o caso deste estudo) acelera o metabolismo do solo, multiplica as populações microbianas e libera uma maior quantidade de enzimas que degradam os compostos orgânicos e aumentam as emissões de C-CO₂ (Souza et al., 2019). Nota-se que o manejo do solo e os fatores ambientais que alteram as comunidades microbianas do solo também alteram os fluxos de CO₂. Portanto, as emissões de CO₂ resultam de interações complexas de diferentes elementos no espaço e no tempo, sendo difícil traçar explicações lineares (Siqueira-Neto et al., 2021). No entanto, ao contrário das emissões de CH₄, os efluxos de CO₂, nestes sistemas, podem ter uma relação positiva com um ecossistema saudável porque abrange a respiração dos organismos do solo e das raízes das plantas, essenciais para o desempenho das funções do solo.

3.5. Conclusão

Independentemente do modelo aplicado, a restauração ecológica da Mata Atlântica por meio do plantio de árvores é uma opção melhor do que a reforma de pastagens para sequestro de C, melhoria da saúde do solo e prestação de serviços ambientais. As florestas em restauração capturaram mais C em reservatórios acima do solo e estão evoluindo progressivamente para restabelecer a matéria orgânica e a saúde do solo em direção ao estado de floresta semidecídua. No entanto, as restaurações de 8 e 15 anos só atingiram o estado da floresta na camada superficial do solo, pois o solo mais profundo ainda carrega legados de degradação histórica anterior, como compactação e matéria orgânica do solo instável.

A mudança do modelo de restauração com a introdução de adubação verde e o escalonamento no tempo do plantio de árvores nativas de acordo com seus grupos funcionais trouxe novos benefícios para a restauração, como melhor supressão de gramíneas invasoras e armazenamento mais rápido de C no solo. No entanto, não

podemos confirmar nossa hipótese de que oito anos de restauração escalonada atingiram o nível de uma restauração tradicional de 15 anos. Isso porque a restauração de 15 anos mostrou maiores estoques de C acima do solo, melhor qualidade da matéria orgânica do solo em camadas mais profundas do solo e menores emissões de gases de efeito estufa, principalmente consumindo mais CH₄ no solo.

Este estudo mostrou que ambos os modelos de restauração estão restaurando eficientemente os estoques de C e N no solo para um ecossistema saudável, beneficiando a natureza e os seres humanos com serviços ecossistêmicos essenciais, como a mitigação das emissões de gases de efeito estufa. Simultaneamente, investigar a quantidade, qualidade e origem da matéria orgânica do solo pode prever o sucesso da restauração, uma vez que sua conjunção estava fortemente relacionada à saúde do solo, fundamental para ecossistemas funcionais saudáveis.

Referências

Amadori, C. et al. Nitrous oxide and methane emissions from soil under integrated farming systems in southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 828, art. 154555, 2022. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154555.

Araújo Neto, S. E. et al. Atividade biológica de solo sob cultivo múltiplo de maracujá, abacaxi, milho, mandioca e plantas de cobertura. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 650–658, 2014. doi: 10.1590/s1806-66902014000400003.

Azevedo, A. D. et al. Estoque de carbono em áreas de restauração florestal da Mata Atlântica. **Floresta**, v. 48, p. 133–142, 2018. doi: 10.5380/ufv.v48.

Balesdent, J.; Wagner, G. H.; Mariotti, A. Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by carbon-13 natural abundance. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, p. 118–124, 1988. doi: 10.2136/sssaj1988.03615995005200010021x.

Banning, N. C. et al. Recovery of soil organic matter, organic matter turnover and nitrogen cycling in a post-mining forest rehabilitation chronosequence. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2021–2031, 2008. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.04.010.

Bayer, C. et al. A method for estimating coefficients of soil organic matter dynamics based on long-term experiments. **Soil and Tillage Research**, v. 91, p. 217–226, 2006. doi: 10.1016/j.still.2005.12.006.

Bento, C. B. et al. Impacts of sugarcane agriculture expansion over low-intensity cattle ranch pasture in Brazil on greenhouse gases. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 980–988, 2018. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.11.085

Bernal, B.; Murray, L. T.; Pearson, T. R. H. Global carbon dioxide removal rates from forest landscape restoration activities. **Carbon Balance and Management**, v. 13, 2018. doi: 10.1186/s13021-018-0110-8.

Bianchini, E.; Pimenta, J. A.; Santos, F. A. M. Spatial and temporal variation in the canopy cover in a tropical semi-deciduous forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 269–276, 2001. doi: 10.1590/S1516-89132001000300008.

Box, G. E. P.; Cox, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Methodological**, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

Brancalion, P. H. S. et al. The cost of restoring carbon stocks in Brazil's Atlantic Forest. **Land Degradation & Development**, v. 32, p. 830–841, 2021. doi: 10.1002/ldr.3764.

Brancalion, P. H. S.; Gandolfi, S.; Rodrigues, R. R. **Restauração florestal**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2015. 432 p.

Brancalion, P. H. S. et al. Balancing economic costs and ecological outcomes of passive and active restoration in agricultural landscapes: the case of Brazil. **Biotropica**, v.48, p. 856–867, 2016. doi: 10.1111/btp.12383.

Bieluczyk, W. et al. Integrated farming systems influence soil organic matter dynamics in southeastern Brazil. **Geoderma**, v. 371, art. 114368, 2020. doi: 10.1016/j.geoderma.2020.114368.

Bieluczyk, W. et al. Eucalyptus tree influence on spatial and temporal dynamics of fine-root growth in an integrated crop-livestock-forestry system in southeastern Brazil. **Rhizosphere**, v. 19, p. 1–13, 2021. doi: 10.1016/j.rhisph.2021.100415.

Cambardella, C. A.; Elliott, E.T. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 777–783, 1992.

Carmo, J. B. et al. Conversion of the coastal Atlantic forest to pasture: Consequences for the nitrogen cycle and soil greenhouse gas emissions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 148, p. 37–43, 2012. doi: 10.1016/j.agee.2011.11.010.

César, R. G. et al. Early ecological outcomes of natural regeneration and tree plantations for restoring agricultural landscapes. **Ecological Applications**, v. 28, p. 373–384, 2018. doi: 10.1002/eap.1653.

Chave, J. et al. Regional and phylogenetic variation of wood density across 2456 neotropical tree species. **Ecological Applications**, v. 16, p. 2356–2367, 2006. doi: 10.1890/1051-0761(2006)016[2356:RAPVOW]2.0.CO;2.

Chave, J. et al. Tree allometry and improved estimation of carbon stocks and balance in tropical forests. **Oecologia**, v. 145, p. 87–99, 2005. doi: 10.1007/s00442-005-0100-x.

Cherubin, M. R. et al. A soil management assessment framework (SMAF) evaluation of brazilian sugarcane expansion on soil quality. **Soil Science Society of America Journal**, v. 80, p. 215–226, 2016. doi: 10.2136/sssaj2015.09.0328.

Cotrufo, M. F. et al. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? **Global Change Biology**, v. 19, p. 988–995, 2013. doi: 10.1111/gcb.12113.

Di Sacco, A. et al. Ten golden rules for reforestation to optimize carbon sequestration, biodiversity recovery and livelihood benefits. **Global Change Biology** v. 27, p. 1328–1348, 2021. doi: 10.1111/gcb.15498.

Don, A.; Schumacher, J.; Freibauer, A. Impact of tropical land-use change on soil organic carbon stocks - a meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 17, p. 1658–1670, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02336.x.

Donagema, G. K. et al. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011.

Ellert, B. H.; Bettany, J.R. Calculation of organic matter and nutrients stored in soils under contrasting management regimes. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 75, p. 529–538, 1995. doi: 10.4141/cjss95-075.

FAO. **The state of the world's forests 2020**: forests, biodiversity and people. Rome: FAO, UNEP, 2020. doi: 10.4060/ca8642en.

Farquhar, G. D.; O'Leary, M. H.; Berry, J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 9, p. 121–137, 1982. doi: 10.1071/PP9820121.

Ferez, A. P. C. et al. Silvicultural opportunities for increasing carbon stock in restoration of Atlantic forests in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 350, p. 40–45, 2015. doi: 10.1016/j.foreco.2015.04.015.

Fernandes, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, p. 227–241, 2002. doi: 10.1016/S0016-7061(01)00150-1.

Guo, L. B.; Gifford, R. M. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. **Global Change Biology**, v. 8, p. 345–360, 2002. doi: 10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x.

Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software: package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p.1–9, 2001.

Han, M.; Zhu, B. Changes in soil greenhouse gas fluxes by land use change from primary forest. **Global Change Biology**, v. 26, p. 2656–2667, 2020. doi: 10.1111/gcb.14993.

ICRAF. Worldwide 'open access' tree functional attributes and ecological database. Gigiri: World Agroforestry Centre, 2022. Disponível em: <http://db.worldagroforestry.org/species>. Acesso em: 3 fev. 2022.

IPCC - Intergovernmental Panel of Climate Change. **Climate Change 2007**: impacts, adaptation and vulnerability. Hanson, CE: Cambridge, 2007. 73 p. (Contribution of working group ii to the fourth assessment report of the IPCC, Parry, M. L. et al.)

Keller, M.; Reiners, W. A. Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide, nitric oxide, and methane under secondary succession of pasture to forest in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 8, p. 399–409, 1994. doi: 10.1029/94GB01660.

Keller, M. et al. Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide, nitric oxide, methane, and carbon dioxide in logged and undisturbed forest in the Tapajos National Forest, Brazil. **Earth Interactions**, v. 9, p. 1–28, 2005. doi: 10.1175/EI125.1.

Koryś, K. A. et al. Early response of soil properties under different restoration strategies in tropical hotspot. **Land**, v. 10, p. 1–14, 2021. doi: 10.3390/land10080768.

Kravchenko, A. N. et al. Microbial spatial footprint as a driver of soil carbon stabilization. **Nature Communications**, v. 10, p. 1–10, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-11057-4.

Kroeger, M. E. et al. Rainforest-to-pasture conversion stimulates soil methanogenesis across the Brazilian Amazon. **The Isme Journal**, v. 15, p. 658–672, 2021. doi: 10.1038/s41396-020-00804-x.

Lal, R. Forest soils and carbon sequestration. **Forest Ecology and Management**, v. 220, p. 242–258, 2005. doi: 10.1016/j.foreco.2005.08.015.

Lavallee, J. M.; Soong, J. L.; Cotrufo, M. F. Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. **Global Change Biology**, v. 26, p. 261–273, 2020. doi: 10.1111/gcb.14859.

Laurance, W. F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1137, 2009. doi: 10.1016/j.biocon.2008.10.011.

Lima, R. A. F. The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Nature Communications**, v. 11, p. 1–16, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-20217-w.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2011.

MapBiomass. **A evolução da pastagem nos últimos 36 anos: destaques do mapeamento anual e qualidade de pastagens no Brasil entre 1985 a 2020**. São Paulo: Projeto MapBiomass, 2021. 17 p. (Coleção, 6) Disponível em: https://mapbiomas-br-site.s3.amazonaws.com/Fact_Sheet_PASTAGEM_13.10.2021_ok_ALTA.pdf. Acesso em: 9 abr. 2022.

Martinelli, L. A. et al. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009.

Matos, F. A. R. et al. Secondary forest fragments offer important carbon and biodiversity cobenefits. **Global Change Biology**, v. 26, p. 509–522, 2020. doi: 10.1111/gcb.14824.

Mayer, M. et al. Influence of forest management activities on soil organic carbon stocks: A knowledge synthesis. **Forest Ecology and Management**, v. 466, art. 118127, 2020. doi: 10.1016/j.foreco.2020.118127.

- Medeiros, E. V. et al. Soil organic carbon, microbial biomass and enzyme activities responses to natural regeneration in a tropical dry region in Northeast Brazil. **Catena**, v. 151, p. 137–146, 2017. doi: 10.1016/j.catena.2016.12.012.
- Mendes, M. S. et al. Look down—there is a gap—the need to include soil data in Atlantic Forest restoration. **Restoration Ecology**, v. 27, p. 361–370, 2019. doi: 10.1111/rec.12875.
- Meyer, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 26, p. 1547–1556, 2017. doi: 10.1111/mec.14011.
- Meyer, K. M. et al. Belowground changes to community structure alter methane-cycling dynamics in Amazonia. **Environment International**, v. 145, 2020. doi: 10.1016/j.envint.2020.106131.
- Milori, D. M. B. P. et al. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v.70, p. 57–63, 2006. doi: 10.2136/sssaj2004.0270.
- Mombrini, L. M. et al. Physical and hydric factors regulating nitrous oxide and methane fluxes in mountainous Atlantic forest soils in southeastern Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 116, art. 103781, 2022. doi: 10.1016/j.jsames.2022.103781.
- Myers, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000. doi: 10.1038/35002501.
- Nogueira Júnior, L. R. et al. Allometric equations for estimating tree biomass in restored mixed-species Atlantic Forest stands. **Biota Neotropica**, v. 14, p. 1–9, 2014. doi: 10.1590/1676-06032013008413.
- Nolan, M. et al. From the ground up: prioritizing soil at the forefront of ecological restoration. **Restoration Ecology**, v. 29, p. 1–5, 2021. doi: 10.1111/rec.13453.
- Oertel, C. et al. Greenhouse gas emissions from soils - a review. **Chemie der Erde**, v. 76, p. 327–352, 2016. doi: 10.1016/j.chemer.2016.04.002.
- Pedrinho, A. et al. Forest-to-pasture conversion and recovery based on assessment of microbial communities in Eastern Amazon rainforest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, p. 1–10, 2019. doi: 10.1093/femsec/fiy236.
- Poorter, L. et al. Biomass resilience of Neotropical secondary forests. **Nature** v. 530, p. 211–214, 2016. doi: 10.1038/nature16512.
- Poorter, L. et al. Multidimensional tropical forest recovery. **Science**, v. 374, n. 6573, p. 1370–1376, 2021. doi: 10.1126/science.abh3629.
- Pütz, S. et al. Long-term carbon loss in fragmented Neotropical forests. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–8, 2014. doi: 10.1038/ncomms6037.
- Raich, J.W., Nadelhoffer, K. J. Belowground carbon allocation in forest ecosystems: global trends. **Ecology**, v. 70, p. 1346–1354, 1989. doi: 10.2307/1938194.

Raij, B. van et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001, 285 p.

Rezende, C. L. et al. From hotspot to hopespot: an opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, p. 208–214, 2018. doi: 10.1016/j.pecon.2018.10.002.

Ribeiro, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141–1153, 2009. doi: 10.1016/j.biocon.2009.02.021.

Rodrigues, R. R. et al. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1242–1251, 2009. doi: 10.1016/j.biocon.2008.12.008.

Rosa, M. R. Hidden destruction of older forests threatens Brazil's Atlantic Forest and challenges restoration programs. **Science Advances**, v.7, p. 1–9, 2021. doi: 10.1126/sciadv.abc4547.

Ros, M.; Hernandez, M. T.; García, C. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 463–469, 2003. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00298-5.

R Studio Team. **Integrated development environment for R**. Boston, MA: RStudio, 2022. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em 23 dez. 2022.

Sá, J. C. M. et al. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. **Environment International**, v. 98, p. 102–112, 2017. doi: 10.1016/j.envint.2016.10.020.

Salimon, C. I. et al. CO₂ flux from soil in pastures and forests in southwestern Amazonia. **Global Change Biology**, v. 10, p. 833–843, 2004. doi: 10.1111/j.1529-8817.2003.00776.x.

Santos, C. H. et al. Performance evaluation of a portable laser-induced fluorescence spectroscopy system for the assessment of the humification degree of the soil organic matter. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 775–783, 2015. doi: 10.5935/0103-5053.20150039.

Segnini, A. et al. Carbon stock and humification index of organic matter affected by sugarcane straw and soil management. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 321–326, 2013. doi: 10.1590/S0103-90162013000500006.

Segnini, A. et al. Soil carbon stock and humification in pastures under different levels of intensification in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 33–40, 2019. doi: 10.1590/1678-992x-2017-0131.

Siqueira-Neto, M. et al. Impacts of land use and cropland management on soil organic matter and greenhouse gas emissions in the Brazilian Cerrado. **European Journal of Soil Science**, v. 72, p. 1431–1446, 2021. doi: 10.1111/ejss.13059.

Shimamoto, C. Y.; Botosso, P. C.; Marques, M. C. M. How much carbon is sequestered during the restoration of tropical forests? Estimates from tree species in the Brazilian Atlantic forest. **Forest Ecology and Management**, v. 329, p. 1–9, 2014. doi: 10.1016/j.foreco.2014.06.002.

Souza, J. P. et al. Carbon Dioxide Emissions in Agricultural Systems in the Brazilian Savanna. **The Journal of Agricultural Science**, v. 11, p. 242, 2019. doi: 10.5539/jas.v11n17p242.

Smith, B. N.; Epstein, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. **Plant Physiology**, v. 47, p. 380–384, 1971. doi: 10.1104/pp.47.3.380.

Sorreano, M. C. M. **Avaliação de aspectos da dinâmica de florestas restauradas, com diferentes idades**. 2002. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. doi: 10.11606/D.11.2002.tde-21082002-140936.

Stedler, P. A. et al. Consequence of forest-to-pasture conversion on CH_4 fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, p. 18547–18554, 1996. doi: 10.1029/96JD01551.

Szpak, P. Complexities of nitrogen isotope biogeochemistry in plant-soil systems: implications for the study of ancient agricultural and animal management practices. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–19, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00288.

Tambosi, L. R. et al. A framework to optimize biodiversity restoration efforts based on habitat amount and landscape connectivity. **Restoration Ecology**, v. 22, p. 169–177, 2014. doi: 10.1111/rec.12049.

Tadini, A.M. et al. Chemical characteristics of soil organic matter from integrated agricultural systems in southeastern Brazil. **European Journal of Soil Science**, v. 73, p. 1–18, 2022b. doi: 10.1111/ejss.13136.

Tadini, A. M. et al. Evaluation of soil organic matter from integrated production systems using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil and Tillage Research**, v. 211, 2021. doi: 10.1016/j.still.2021.105001.

Tadini, A. M. et al. Soil organic matter in podzol horizons of the Amazon region: Humification, recalcitrance, and dating. **Science of The Total Environment**, v. 613–614, p. 160–167, 2018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.068.

Tadini, A. M. et al. Spectroscopic characteristics of humic acids extracted from soils under different integrated agricultural production systems in tropical regions. **Geoderma Regional**, v. 28., 2022a. doi: 10.1016/j.geodrs.2021.e00476.

Tadini, A. M. et al. The importance of humin in soil characterisation: a study on Amazonian soils using different fluorescence techniques. **Science of the Total Environment**, v. 537, p. 152–158, 2015. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.125.

Teixeira, H. M. et al. Linking vegetation and soil functions during secondary forest succession in the Atlantic forest. **Forest Ecology and Management**, v. 457, art. 117696, 2020. doi: 10.1016/j.foreco.2019.117696.

Tivet, F. et al. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207–208, p. 71–81, 2013. doi: 10.1016/j.geoderma.2013.05.001.

Venturini, A. M. et al. Increased soil moisture intensifies the impacts of forest-to-pasture conversion on methane emissions and methane-cycling communities in the Eastern Amazon. **Environmental Research**, v. 212, p. 113-139, 2022. doi: 10.1016/j.envres.2022.113139.

Verchot, L. V. et al. Land-use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of eastern Amazonia. **Ecosystems**, v. 3, p. 41–56, 2000. doi: 10.1007/s100210000009.

Wander, M. M. Soil organic matter fractions and their relevance to soil function. In: Magdoff, F.; Weil, R. (eds.). **Soil organic matter in sustainable agriculture**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 62–90. doi: 10.1201/9780203496374.ch3.

Siqueira-Neto, M. et al. Impacts of land use and cropland management on soil organic matter and greenhouse gas emissions in the Brazilian Cerrado. **European Journal of Soil Science**, v. 72, p. 1431–1446, 2021. doi: 10.1111/ejss.13059.

Wang, W. et al. Impact of straw management on seasonal soil carbon dioxide emissions, soil water content, and temperature in a semi-arid region of China. **Science of the Total Environment**, v. 652, p. 471–482, 2019. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.207.

Weidlich, E. W. A. et al. Controlling invasive plant species in ecological restoration: a global review. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, p. 1806–1817, 2020. doi: 10.1111/1365-2664.13656.

Xavier, A. A. P. et al. Evaluation of carbon content and humification index of soils under the application of by-products from sugarcane processing. **Microchemical Journal**, v. 149, art. 104041, 2019. doi: 10.1016/j.microc.2019.104041.

Zanini, A. M. et al. The effect of ecological restoration methods on carbon stocks in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 481, 2021. doi: 10.1016/j.foreco.2020.118734.

Zhao, J. F. et al. Tropical forest soils serve as substantial and persistent methane sinks. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–9, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-51515-z.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É iminente a necessidade da realização de mais estudos que abordam outros aspectos da dinâmica das florestas, com o intuito de estabelecer padrões, dependendo de cada bioma, para tornar o solo um indicador fundamental aplicado em temas de sustentabilidade dos ecossistemas florestais, tanto nos aspectos do manejo sustentável como nos da restauração de florestas degradadas.

Também é necessário que a comunidade científica e social valorize ainda mais iniciativas de recuperação já realizadas no território, contextualizando os avanços, reconhecendo as intervenções bem-sucedidas e trabalhando as limitações e dificuldades ainda presentes.

Um horizonte de boas perspectivas é estimular parcerias público-privadas, como no caso do presente trabalho, a bem-sucedida interação entre pesquisadores da Universidade de São Paulo e a fazenda Capoava. A parceria resultou em uma relação positiva para ambos, na qual a propriedade rural atendeu ao Código Florestal Brasileiro (Lei Federal nº 12.561) e passou a contar com a certificação ambiental de seus produtos. Ao mesmo tempo, ecólogos têm desenvolvido pesquisas sobre novos modelos de restauração nessas áreas.

Esperamos que as informações fornecidas pelo presente trabalho colaborem com cientistas e formuladores de políticas ambientais, apontando que a integração do solo nas avaliações do ecossistema é fundamental para fornecer avanços bem-sucedidos em projetos de restauração ecológica. Não foi possível encontrar múltiplos fragmentos florestais padronizados com a mesma idade, modelo de restauração e características de solo, principalmente pela dificuldade de áreas que obedeçam a randomização e tamanho mínimo das parcelas, o que é muito comum e mais acessível em experimentos agrícolas, por exemplo. No entanto, fornecemos aqui informações comparáveis sobre a restauração do ecossistema, especialmente do solo, que é urgentemente necessário.

APÊNDICES

Apêndice A: Material suplementar do capítulo 1

Os materiais suplementares incluem: tabela suplementar: Tabela S1~S6 e figuras suplementares: Fig S1~S6



Figura suplementar S1. Foto da área de pastagem.



Figura suplementar S2. Foto da área de restauração ativa com 7 anos.



Figura suplementar S3. Foto da área de restauração ativa com 14 anos.



Figura suplementar S4. Área de fragmento de vegetação nativa da Mata Atlântica.

Coleta de Gases

As coletas do CH₄, CO₂ e N₂O no campo foram realizadas no mesmo dia da amostragem de solo, com a utilização de câmaras estáticas específicas para esse tipo de abordagem, as câmaras foram instaladas em um dia e a quantificação foi feita no dia seguinte. Foram coletados os gases acumulados no interior de câmaras estáticas durante o período de 30 min. A primeira amostra foi coletada logo após o fechamento da câmara e as amostras remanescentes foram coletadas após 10', 20' e 30' do fechamento da câmara. Foram retirados aproximadamente 20 mL de gás com o auxílio de uma seringa de nylon tipo BD de 20 mL. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro vedado com tampas de borracha, para evitar contaminação pelo ar atmosférico. Durante o período de coleta foram medidas a temperatura do solo, pressão atmosférica, temperatura do ar, umidade do solo e umidade do ar.

Os fluxos foram calculados a partir da alteração da concentração do gás no interior das câmaras em função do tempo de incubação conforme as Equações (2 e 3):

$$\mathbf{GEE}_{\mu\text{g}} = \mathbf{GGE}_{\text{ppm}} * \mathbf{GGE}_{\text{MM}} * [(P_{\text{atm}} * V_L)/(R * T_K)] \quad (\text{Equação 2})$$

$$\mathbf{Fluxo} \mu\text{gGGE g}^{-1} \text{ solo h}^{-1} = (d[\mathbf{GEE}_{\mu\text{g}}]/dt) * \mathbf{solo}_g * 60_{\text{min}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: **GEE**_{μg} = massa de GGE (μg); **GGE**_{ppm} = valor de GGE obtido no espectrômetro (ppm); **GGE**_{MM} = massa molar do GGE; **P**_{atm} = pressão ambiente (atm); **V**_L = volume do frasco (L); **R** = constante dos gases ideais (0,082); **T**_K = temperatura (K); **solo**_g = massa de solo (g); **(d[GEE_{μg}]/dt)** = alteração da concentração do GEE_{μg} em função do tempo.

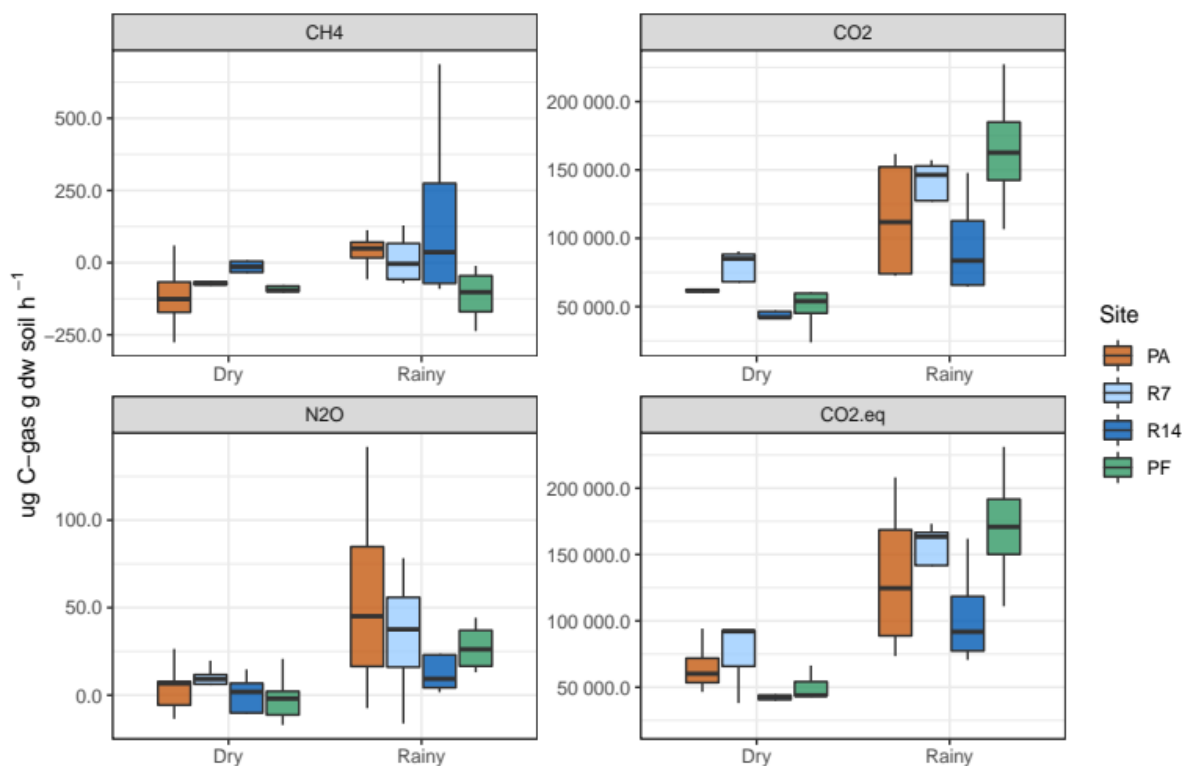


Figura suplementar S5. Quantificação das emissões de CH₄, CO₂, N₂O e CO₂-eq nas áreas de estudo nas estações seca e chuvosa.

Tabela suplementar S1: Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA) de dados de fluxos de gás (unidade) em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e uma única plantação com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Fluxos de gás (unidade)</i>									
CH ₄	3	2.078	0.126	1	3.147	0.087	3	0.749	0.532
CO ₂	3	2.168	0.114	1	53.491	<0.001	3	2.110	0.122
N ₂ O	3	1.119	0.358	1	12.144	0.002	3	0.724	0.546
CO ₂ -eq	3	1.119	0.358	1	12.144	0.002	3	0.724	0.546

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

Atributos químicos do solo

Tabela suplementar S2. Caracterização de propriedades químicas em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta semidecídua primária (PF), pastagem (PA) e restauração ativa utilizando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) em estações úmidas e secas.

Atributos	Chuvosa				Seca			
	FP	PA	R7	R14	FP	PA	R7	R14
<i>Propriedades químicas</i>								
pH (CaCl ₂)	5,2±0,6	5,6±0,5	5,5±0,6	4,4±0,3	5±0,2	6±0,4	5,4±0,8	4,6±0,4
MO (g.dm ⁻³)	53,4±3,5	39,6±10,8	35,4±9,1	34±3,8	45,8±7,3	47±3,7	38±10,2	39,4±2,2
P (mg.dm ⁻³)	21,8±9,8	18,4±12,9	5,2±2,4	18,4±8,6	9,4±3,0	27±12,4	10,6±10	18,4±3,6
S (mg.dm ⁻³)	4,8±2,3	4,2±2,8	7,2±3,8	4±1,4	5,4±4,3	3,8±1,3	3,8±1,1	4,6±1,9
K (mmolc.dm ⁻³)	6,1±1,4	6,5±3,7	4,9±1,9	3,1±1,2	4,2±1,6	6,5±1,9	3,6±1,7	2,2±0,5
Ca (mmolc.dm ⁻³)	72,4±25,7	50,4±13,5	43,8±9	18,6±4,2	44,4±7,5	54,2±14,5	41,6±18,1	23,2±7,6
Mg (mmolc.dm ⁻³)	23±7,5	12,2±4	16,8±6,5	7,8±1,8	19±3,5	20,6±6,9	14,6±6,8	11,2±4,6
Al (mmolc.dm ⁻³)	0,6±0,54	0,2±0,44	3±1,41	0,4±0,89	0,2±0,44	0±0	1,4±1,14	0,2±0,44
Sat. Bases (V%)	69,2±14,5	72,6±12,9	39,6±7,7	71,8±13,3	62,6±7,8	79±7,7	42,4±12,2	68,6±18
N (mg/Kg)	2632±670,7	1946±151,8	1064±310,7	1260±178,5	1526±151,8	1498±307,5	1064±600,9	1190±110,7
NH ₄ ⁺ (ug N/g)	4,05±2	1,14±0,99	1,66±1,16	0,93±1,09	3,8±1,32	4,26±2,26	2,7±0,96	1,85±2,11
B (mg.dm ⁻³)	0,6±0,2	0,4±0,2	0,4±0,1	0,48±0,2	0,73±0,2	0,7±0,2	0,5±0,2	0,6±0,2
Cu (mg.dm ⁻³)	0,5±0,2	0,8±0,3	0,7±0,1	0,6±0,2	0,5±0,2	0,7±0,1	0,8±0,1	0,6±0,2
Fe (mg.dm ⁻³)	71,2±39	70,2±86,7	56,8±40,9	190±35,9	69±29,1	40,3±11,2	51,7±37,5	134,9±41,7
Mn (mg.dm ⁻³)	68,5±9	23,3±6,1	30,8±9,9	19,6±5,4	72,9±14,6	22,2±5,3	28,6±21,8	14,9± 1,4
Zn (mg.dm ⁻³)	16,6±8	5,4±3,4	4,2±1,9	3,5±0,7	12±5,7	8,8±2,9	5±3,6	3,9±0,7

Tabela suplementar S3. Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) de dados de propriedades químicas em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14) nas estações chuvosa e seca.

Dados	Área			Estação			Área x Estação		
	df	F	p-value	df	F	p-value	df	F	p-value
<i>Propriedades químicas</i>									
pH	3	13.731	<0.001	1	0.176	0.676	3	0.754	0.527
MO	3	7.417	<0.001	1	0.445	0.509	3	2.677	0.063
P	3	5.942	0.002	1	0.034	0.853	3	2.775	0.057
S	3	0.789	0.508	1	0.706	0.406	3	0.688	0.565
K	3	7.985	<0.001	1	2.563	0.119	3	0.952	0.426
Ca	3	14.331	<0.001	1	1.543	0.223	3	2.330	0.092
Mg	3	9.567	<0.001	1	0.686	0.413	3	3.066	0.041
Al	3	11.786	<0.001	1	10.308	0.003	3	2.027	0.129
H+Al	3	8.254	<0.001	1	<0.001	0.980	3	0.300	0.824
SB	3	15.647	<0.001	1	0.388	0.537	3	2.705	0.061
CTC	3	19.275	<0.001	1	1.646	0.208	3	6.804	0.001
V%	3	12.149	<0.001	1	0.015	0.903	3	0.322	0.808
M%	3	12.802	<0.001	1	9.790	0.003	3	2.441	0.082
B	3	2.489	0.078	1	4.629	0.039	3	0.170	0.915
Cu	3	4.756	0.007	1	0.025	0.873	3	0.602	0.618
Fe	3	9.645	<0.001	1	1.841	0.184	3	0.983	0.412
Mn	3	19.043	<0.001	1	0.246	0.622	3	0.600	0.619
Zn	3	16.504	<0.001	1	0.002	0.960	3	1.011	0.400
NH ₄ ⁺	3	4.421	0.010	1	4.737	0.037	3	1.610	0.206
N	3	17.417	<0.001	1	20.121	<0.001	3	5.410	0.003

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

Atributos físicos do solo

Tabela suplementar S4. Caracterização das propriedades físicas na camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa utilizando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14). Ds= densidade do solo; P.Total= porosidade total; Mic P= Microporosidade e Mac P= Macroporosidade.

Propriedades Físicas	Ds (g.dm ⁻³)	P. Total	Mic P	Mac P
<i>Propriedades físicas</i>				
PF	1.22±0.024	0.53±0.009	0.26±0.02	0.26±0.02
R7	1.475±0.02	0.443±0.009	0.218±0.006	0.224±0.011
R14	1.46±0.05	0.447±0.02	0.23±0.01	0.20±0.01
PA	1.55±0.06	0.413±0.02	0.24±0.005	0.173±0.03

Tabela suplementar S5. Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) de dados de propriedades físicas em camada de solo de 0-10 cm sob áreas de floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA) e restauração ativa usando plantio escalonado com sete anos (R7) e um único plantio com quatorze anos (R14). Ds= densidade do solo; P.Total= porosidade total; Mic P= Microporosidade e Mac P= Macroporosidade.

Dados	df	Área	
		F	p-value
<i>Propriedades físicas</i>			
Ds (g.cm ⁻³)	3	11.653	<0.001
P. Total	3	11.653	<0.001
Mic P	3	1.681	0.210
Mac P	3	5.736	0.007

Valores em negrito indicam significância estatística em $p < 0,05$ (p-valor).

Rede de coocorrência

Tabela suplementar S6. Os 10 principais ASVs de keynode com mais centralidade de intermediação e número de correlações (ou seja, grau) para cada tratamento.

Área	ASV	Classificação	Centralidade de intermediação ^a	Grau ^b
Pasto	ASV1127	Proteobacteria - Xanthobacteraceae	4899.6383	32
	ASV194	Actinobacteria - <i>Rugosimonospora</i>	4367.6523	60
	ASV617	Firmicutes - <i>Lysinibacillus</i>	4137.3179	44
	ASV1486	Verrucomicrobiota - Pedosphaeraceae	4126.6877	30
	ASV920	NB1	4070.6228	42
	ASV262	Actinobacteriota - <i>Gaiella</i>	3775.6343	36
	ASV997	Planctomycetota - Pirellulaceae	3595.4550	46
	ASV874	Methylomirabilota - Rokubacteriales	3466.8321	25
	ASV1037	Proteobacteria - <i>Dongia</i>	3416.8735	48
	ASV46	Acidobacteriota - <i>Aridibacter</i>	3303.7926	41
R7	ASV891	Myxococcota - <i>Haliangium</i>	5445.71737	32
	ASV169	Actinobacteriota - <i>Pseudarthrobacter</i>	4000.4189	20
	ASV41	Acidobacteriota - Subgroup 2	3286.2178	91
	ASV1197	Proteobacteria - <i>Burkholderia</i>	2885.1332	38
	ASV80	Acidobacteriota - Vicinamibacterales	2639.1991	31
	ASV669	Firmicutes - <i>Paenibacillus</i>	2408.2717	71
	ASV1266	Proteobacteria - Burkholderiales	2320.9847	66
	ASV471	Chloroflexi - KD4-96	2238.5903	26
	ASV1096	Proteobacteria - <i>Rhizobium</i>	2197.1400	39
	ASV294	Bacteroidota - Muribaculaceae	2179.4092	39
R14	ASV129	Actinobacteriota - Frankiales	4199.6185	19
	ASV957	Planctomycetota - OM190	3888.9132	57
	ASV1074	Proteobacteria - <i>Microvirga</i>	3713.8993	39
	ASV435	Chloroflexi - Anaerolineaceae	3467.7648	17
	ASV979	Planctomycetota - Pla4 lineage	3425.5217	38

	ASV1086	Proteobacteria - <i>Pedomicrobium</i>	3251.9078	63
	ASV72	Acidobacteriota - Thermoanaerobaculaceae	3246.0063	34
	ASV1269	Proteobacteria - Burkholderiales	3071.1305	85
	ASV263	Actinobacteriota - Gaiellales	3047.3365	44
	ASV52	Acidobacteriota - Blastocatellaceae	2860.3727	41
Floresta primária	ASV471	Chloroflexi - KD4-96	3663.0053	46
	ASV259	Actinobacteriot - MB-A2-108	3525.2461	55
	ASV102	Actinobacteriota - <i>Catenulispora</i>	3283.1932	16
	ASV75	Acidobacteriota - Vicinamibacteria	3108.7923	25
	ASV876	Myxococcota	2999.3703	34
	ASV1019	Proteobacteria - Acetobacteraceae	2972.7686	43
	ASV1042	Proteobacteria - Elsterales	2861.6409	57
	ASV1123	Proteobacteria - <i>Pseudolabrys</i>	2825.8287	17
	ASV261	Actinobacteriota - Rubrobacter	2678.0412	27
	ASV28	Acidobacteriota - Acidobacteriaceae	2609.0244	19

^aA fração de casos em que um nó se encontra no caminho mais curto entre todos os pares de outros nós, interpretados como espécies-chave.

^bNúmero de conexões/correlações obtidas pela análise SparCC.

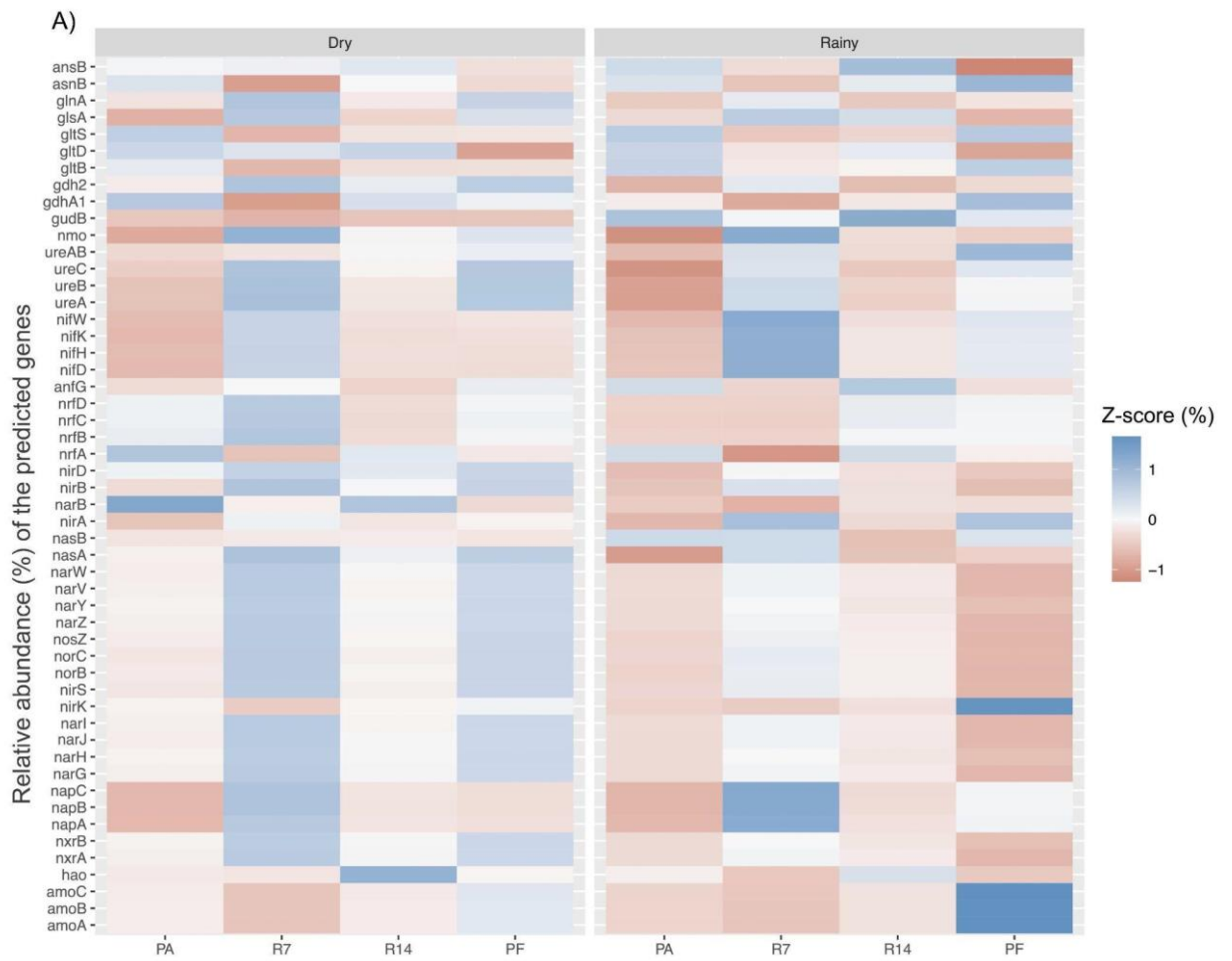


Figura suplementar S6: Abundância relativa com base no Z-score de genes relacionados ao ciclo do nitrogênio (a) e a soma de todos os genes envolvidos nas funções ligadas a este ciclo.

Apêndice B: Material suplementar do capítulo 2

Os Materiais Suplementares incluem: Tabela Suplementar: Tabela S7 e Figuras Suplementares: Fig. S6~S11

Tabela suplementar S7: Descrição dos primers usados na qPCR.

Gene	Grupo alvo	Primers	Sequência (5'-3')	Comprimento do fragmento (pb)	Referências
<i>nifH</i>	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	17167F 17167R	AAAGGYGGWATCGGYAAR TCCACCAC TTGTTSGCSGCRTACATSGC CATCAT	432	Wallenstein and Vilgalys (2005)
<i>pmoA</i>	Bactérias Metanotróficas	A189F MB661R	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTAAAC	472	Holmes et al. (1995) Costello and Lidstrom (1999)
<i>mcrA</i>	Archaea metanogênica	mlas mcrA-R	GGTGGTGMGGDTTCACM CARTA CGTTCATBGCGTAGTTVGG RTAGT	469	Angel et al. (2012); Steimberg and Regan (2008)

Parâmetros adicionais para fluxos de GEE

Durante a incubação da câmara para quantificação do fluxo de CO₂ e CH₄, medimos a temperatura do solo usando um termômetro inserido de 3 a 5 cm no solo e a temperatura do ar usando um termo-higrômetro. O solo foi amostrado nas camadas de 0-10, 10-20 e 20-30 cm. Pesamos 100 gramas de solo em condições de campo, secamos em estufa a 105 °C por 48 h e pesamos novamente para quantificar a umidade do solo conforme descrito em Donagema et al. (2011).

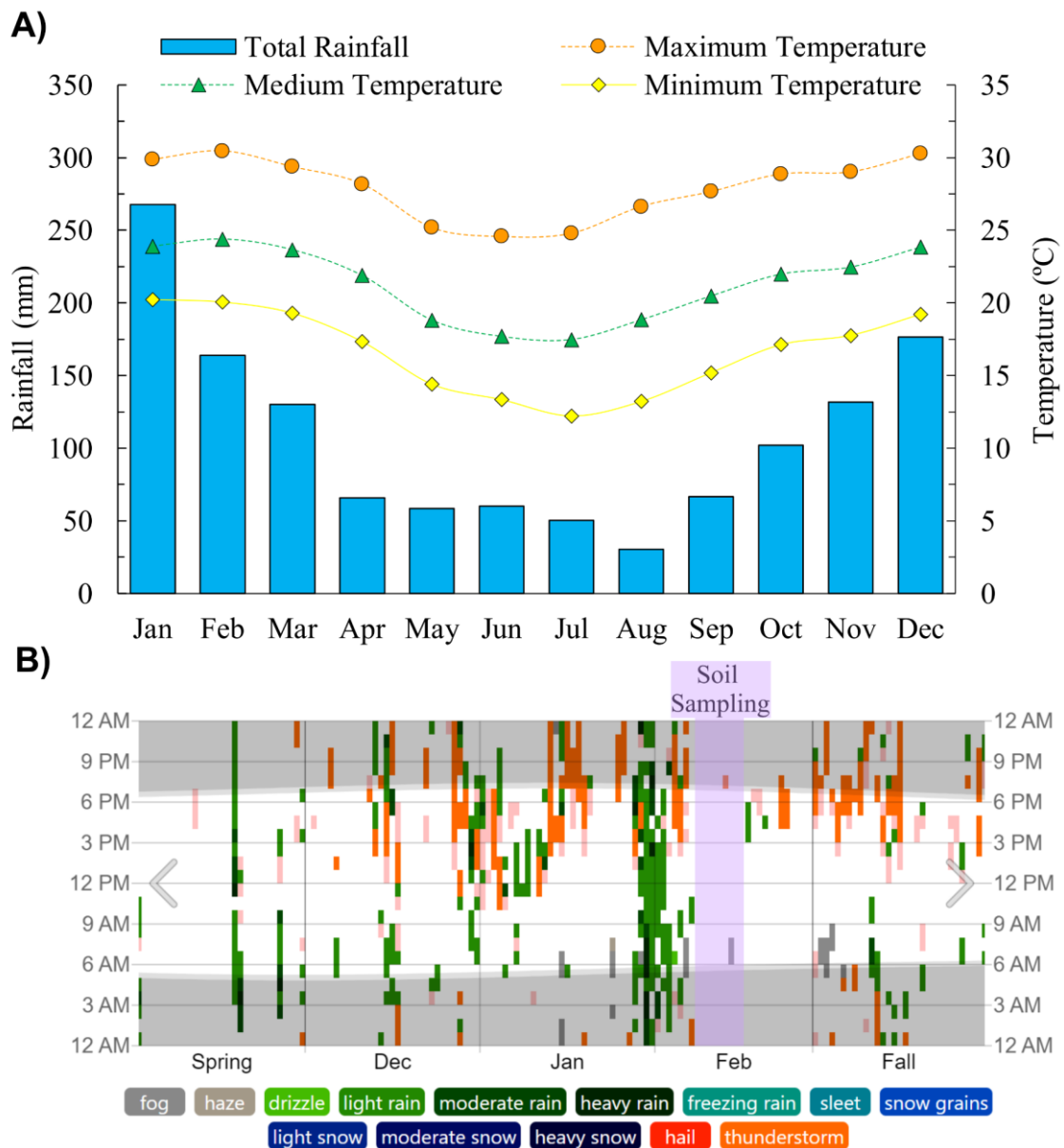


Figura suplementar S7. Precipitação total mensal e temperaturas do ar atmosférico mínima, média e máxima mensais para a série climatológica histórica (1990-2020) na cidade vizinha de Itu-SP (A) (Fonte: INMET - estação meteorológica de Sorocaba – A713) e intensidades pluviométricas dias antes da amostragem do solo (B) (Fonte: <https://weatherspark.com/>).



Figura suplementar S8. Equipamento utilizado para medir os fluxos de CO₂ e CH₄ do solo em campo. O dispositivo amarelo corresponde ao analisador Gaset DX4015 GHG alimentado por uma fonte de bateria (esquerda) e conectado a uma câmara estática (direita) em circulação de ar fechada contínua e incubação.

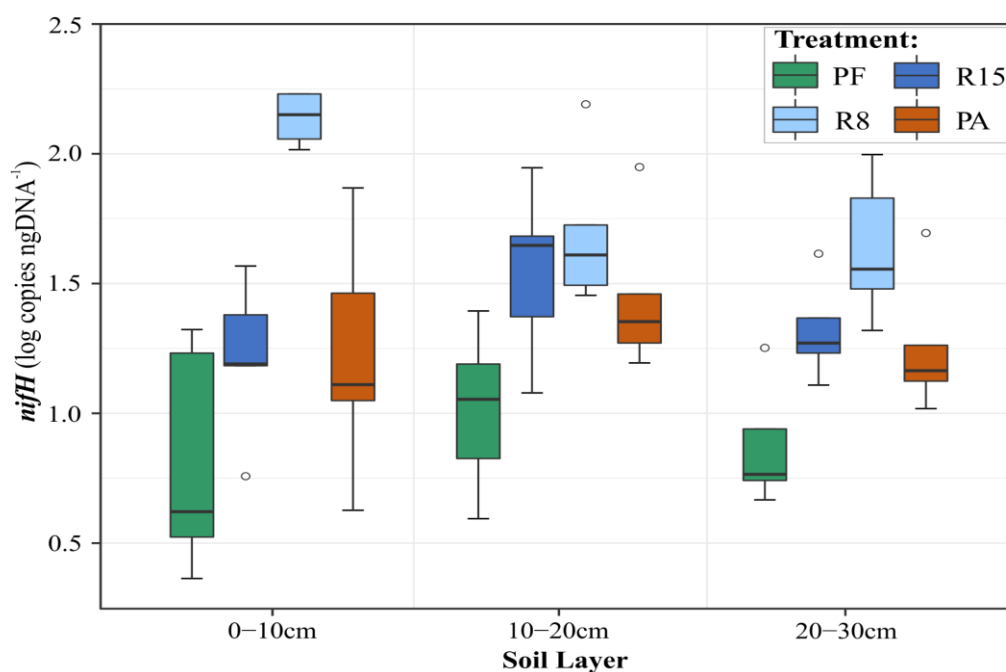


Figura suplementar S9. Número de cópias por ng de DNA (cópias ng DNA⁻¹) do gene *nifH* em floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa com plantio escalonado com oito anos (R8) e restauração ativa com base em plantio único com quinze anos (R15).

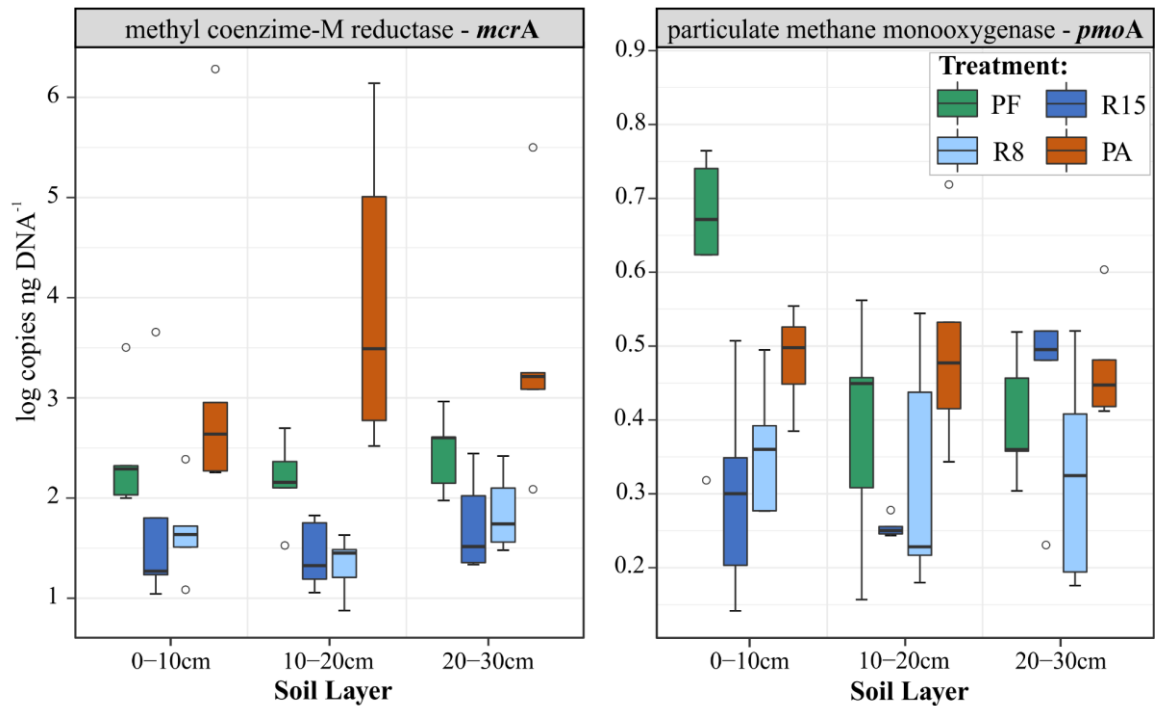


Figura suplementar S10. Número de cópias por ng de DNA (cópia ng DNA⁻¹) dos genes *mcrA* e *pmoA* em floresta primária semidecídua (PF), pastagem (PA), restauração ativa com plantio escalonado com oito anos (R8) e restauração ativa com base em um único plantio com quinze anos (R15).

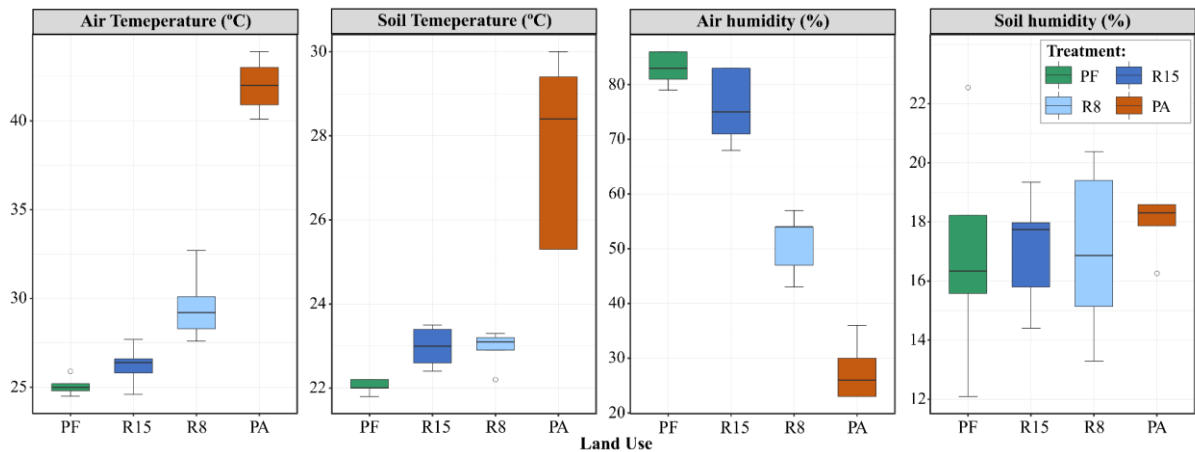


Figura suplementar S11. Temperatura média do ar e do solo e umidade do ar e do solo (0-30 cm) durante a avaliação de gases de efeito estufa em campo em floresta semidecídua primária (PF), pastagem (PA), restauração ativa com plantio escalonado com oito anos (R8), e restauração baseada em uma única plantação com quinze anos (R15).