

**RODRIGO REIS MOURA**

**FATORES QUE MODULAM A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO:  
INFLUÊNCIAS DO pH E DA COBERTURA VEGETAL**



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2019**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Caio Tavora Rachid Coelho da Costa e coorientação de Eduardo da Silva Fonseca.**

## CIP - Catalogação na Publicação

R924f Reis Moura, Rodrigo  
Fatores que modulam a comunidade bacteriana:  
influências do pH e da cobertura vegetal. / Rodrigo  
Reis Moura. -- Rio de Janeiro, 2019.  
46 f.

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa .  
Coorientador: Eduardo da Silva Fonseca.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Microbiologia do solo. 2. Solo. 3. Microbioma  
. 4. Bioinformática. I. Tavora Rachid Coelho da  
Costa , Caio, orient. II. da Silva Fonseca, Eduardo  
, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Rodrigo Reis Moura**  
 DRE: 115025529

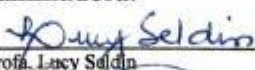


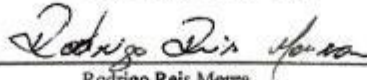


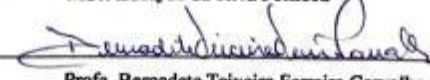
BANCA EXAMINADORA: **Profa. Lucy Seldin (Presidente)**  
**MSc. Jackeline Rossetti Mateus de Lacerda**  
**MSc. Phillipe Rosado Magalhães**  
**Profa. Eliana Barreto Begter (Suplente)**

Título da Monografia: **"Fatores que modulam a comunidade bacteriana:  
 influências do pH e da cobertura vegetal"**

Local: **Sala de reunião do Departamento de Microbiologia Geral / IMPPG / CCS / UFRJ**  
 Data e hora de início: **11 de dezembro de 2019 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de .....12..... de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,0</u>	 _____ Prof. Lucy Seldin
<u>9,0</u>	 _____ MSc. Jackeline Rossetti Mateus de Lacerda
<u>9,0</u>	 _____ MSc. Phillipe Rosado Magalhães
	_____ Prof. Eliana Barreto Begter
Aluno:	 _____ Rodrigo Reis Moura
Orientador:	 _____ Prof. Caio T. Raciold C. da Costa
Coorientador:	 _____ MSc. Eduardo da Silva Fonseca
Coordenador de TCC	 _____ Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho a minha mãe,  
Aparecida, ao meu irmão, Bruno, e aos  
meus amigos Caio e Eduardo.

## Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, de onde sempre tiro minhas forças e, que mesmo sem eu dar a devida atenção, me guia e protege pelos caminhos da vida.

À minha família que em diversos momentos, mesmo com suas limitações, me apoiou quando precisei.

À minha Mãe que em momento algum mediu esforços para que eu chegasse à faculdade e concluísse meus estudos. Quantas vezes chorou, rezou, fez o que estava a seu alcance para que eu continuasse. Você será sempre o meu orgulho e principal motivação para as minhas conquistas e sempre farei o que estiver ao meu alcance para retribuir tudo o que fez por mim.

Ao meu pai, que mesmo em suas limitações, me proporcionou uma educação de qualidade e subsídios para que pudesse chegar a este momento.

Ao meu irmão, Bruno, e à sua esposa, Gabriela; sem o apoio de vocês no início nada disso estaria acontecendo agora. Desde quando passei e nem sequer conhecia a microbiologia, vocês estão sempre me apoiando.

Ao meu orientador, amigo, e muitas vezes pai, Caio, que desde o início da faculdade me acolheu e me ajudou. Obrigado por todos os conselhos e tudo que me ensinou. Tenho orgulho de ser seu primeiro aluno de graduação. Sei que em diversos momentos não merecia isso, e que você relevou muitos dos meus erros por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava. Nunca vou esquecer tudo que você fez por mim.

Ao meu orientador, irmão, amigo de carona, Eduardo, meu muito obrigado por tudo! Pelas caronas, piadas, ajudas e pela infinidade de conselhos e conhecimentos que me passou. Junto com o Caio acreditou em mim e sou muito grato a tudo isso. E como você diz, o dia chegou, “Hosana nas alturas!”.

Ao amigo Fabiano Balieiro, que sempre colaborou e esteve disposto a colaborar com o trabalho.

Aos meus amigos do LABEM, principalmente, Diogo, Mateus e Douglas que sempre aliviaram o peso de horas para chegar ao Fundão ou de uma aula pesada com uma conversa ou uma piada.

Aos demais alunos do LABEM que tornaram a correria deste ano um pouco mais leve com a companhia.

Agradeço também ao Henrique e ao Anderson que com toda disponibilidade me aconselharam no início da faculdade.

Aos amigos do LEMM, principalmente Edir, Denise, Phillipe, Carol (que agora é do LABEM), Hugo, Caren, Helena, Deborah e Laís, obrigado por todo apoio que me deram durante este período.

Aos meus amigos Diogo, Stanley e Eduardo, obrigado por sempre estarem comigo durante a faculdade e apoiarem em tudo que precisei.

Agradeço a UFRJ, por me proporcionar todo um ambiente e estrutura para desenvolver este trabalho. Ao CNPQ pela bolsa de iniciação científica.

## RESUMO

**RODRIGO REIS MOURA**

### **FATORES QUE MODULAM A COMUNIDADE MICROBIANA: INFLUÊNCIAS DO pH E DA COBERTURA VEGETAL.**

**Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O solo é um ambiente complexo e heterogêneo, reservatório de nutrientes de diversos ciclos biogeoquímicos e possui uma das maiores diversidades de micro-organismos do Planeta. Grande parte destes micro-organismos está associada às plantas, mantendo relações ecológicas. Esta microbiota sofre influência de diversos fatores ambientais, como o pH e o próprio tipo de planta. Contudo, o grau de influência de cada um desses fatores ainda está sob debate na literatura. Objetivando quantificar a influência que as mudanças do pH e da cobertura vegetal têm sobre os micro-organismos, foi estabelecido um experimento fatorial utilizando duas espécies de plantas e quatro faixas de pH como fatores. Amostras de solo com pH 4,3 foram submetidas a um aumento gradual de pH, com a adição de  $\text{CaCO}_3$ , alcançando quatro faixas diferentes (4,7, 5,4, 7,5 e 8,2). Cada faixa de pH foi plantada em quadruplicata com milho e com feijão, somando 32 vasos. Estes foram incubados e monitorados em casa de vegetação por 60 dias. Ao fim, foi realizada a extração do DNA total das amostras de solo rizosférico de cada um dos vasos, e o DNA obtido foi enviado para sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S. As sequências genéticas foram submetidas a análises de bioinformática para determinação dos dados de alfa e beta diversidade. Observou-se um efeito significativo da interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) sobre a alfa-diversidade, ou seja, o pH atua na alfa-diversidade, mas a resposta depende do tipo de planta no solo. Para o feijão a faixa 5,4 apresenta maior diversidade, com declínio nas faixas mais extremas. Já para milho ocorre um aumento das diversidades nas extremidades, sendo a faixa 4,7 com maior diversidade e declínio nas faixas centrais. Houve predomínio dos filos Firmicutes, Proteobacterias e Actinobacteria. Dos 20 filos mais abundantes, apenas os filos Acidobacteria e Actinobacteria foram influenciados pelo pH, observado pela correlação de Spearman. Através da ordenação multidimensional não métrica, baseada no índice de similaridade de Bray-Curtis, observou-se uma atuação dos dois fatores sobre a estruturação da comunidade. O pH atua mais fortemente modulando a comunidade, com diferenças entre o pH ácido para o pH básico. A cobertura vegetal também atua alterando a comunidade, porém em menor intensidade.

**Palavras-chave:** microbioma, moduladores, solo, sequenciamento, bioinformática



## ABSTRACT

**RODRIGO REIS MOURA**

FACTORS THAT MODULATE THE MICROBIAL COMMUNITY: INFLUENCES OF PH  
AND VEGETABLE COVERAGE

**Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The soil is a complex and heterogeneous environment, a nutrient reservoir of various biogeochemical cycles and has one of the largest diversity of microorganisms on the planet. Most of these microorganisms are associated with plants, maintaining ecological relationships. This microbiota is influenced by several environmental factors, such as pH and the type of plant itself. However, the degree of influence of each of these factors is still under debate in the literature. Aiming to quantify the influence that changes in pH and vegetation cover have on microorganisms, a factorial experiment was established using two plant species and four pH ranges as factors. Soil samples with pH 4.3 were subjected to a gradual pH increase with the addition of CaCO<sub>3</sub>, reaching four different ranges (4.7, 5.4, 7.5 and 8.2). Each pH range was planted in quadruplicate with corn and beans, totaling 32 pots. These were incubated and monitored in a greenhouse for 60 days. Finally, the total DNA was extracted from the rhizospheric soil samples from each of the vessels, and the DNA obtained was sent for sequencing of the 16S rRNA encoding gene. Genetic sequences were subjected to bioinformatics analysis to determine alpha and beta diversity data. There was a significant effect of the interaction between factors ( $p < 0.05$ ) on alpha-diversity, ie pH acts on alpha-diversity, but the response depends on the type of plant in the soil. For beans, the 5.4 range has greater diversity, with decline in the most extreme ranges. Already for corn there is an increase in diversity in the extremities, with the range 4.7 with greater diversity and decline in the central bands. Firmicutes, Proteobacterias and Actinobacteria predominated. Of the 20 most abundant phyla, only the Acidobacteria and Actinobacteria phyla were influenced by pH, observed by Spearman correlation. Through the non-metric multidimensional ordering, based on the Bray-Curtis similarity index, it was observed an action of the two factors on the structuring of the community. The pH acts more strongly modulating the community, with differences between acidic pH and basic pH. The vegetation cover also acts altering the community, but to a lesser extent.

**Keywords:** microbiome, modulators, soil microbiology, soil pH, bioinformatics.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1. O SOLO.....	11
1.2. MICROBIOLOGIA DOS SOLOS.....	14
1.3. pH.....	15
1.4. COBERTURA VEGETAL.....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
3.1. ETAPAS DESENVOLVIDAS:.....	20
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DO SOLO.....	21
4.2. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE DOSE DE $\text{CaCO}_3$ X PH DO SOLO.....	22
4.3. MONTAGEM E MONITORAMENTO DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	22
4.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	24
4.4. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	24
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
<b>9. ANEXO I – CÁLCULOS PARA CURVA DOSE X RESPOSTA.....</b>	<b>43</b>
<b>10. ANEXO II - CÁLCULOS DE MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES ...</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura é um importante componente da economia brasileira, do início da sua colonização brasileira até os dias de hoje. Segundo o IBGE, no ano de 2017, houve crescimento de 1% no Produto Interno Bruto (PIB) depois de seguidos anos de retração econômica, alavancado principalmente pelo agronegócio. Este teve um crescimento de 17% em relação ao ano anterior devido à safra recorde.

Dada a importância do setor para o país, o desenvolvimento de tecnologias que possam melhorar o processo produtivo agrícola é de suma importância. Com o objetivo de expandir a produção agropecuária, diversas áreas acadêmicas atuam com o intuito de fornecer subsídios tecnológicos. Assim, pesquisas relacionadas ao melhoramento genético vegetal, tecnologia de irrigação, controle de pragas, otimização de fertilizantes e manutenção do teor nutricional do solo são desenvolvidas para o setor agropecuário.

Neste contexto, destaca-se a interação da microbiota com as plantas. Na década de 1960, os trabalhos realizados pela pesquisadora Johanna Döbereiner, em conjunto com a EMBRAPA, demonstraram a importância dos micro-organismos no fornecimento de nitrogênio em cultivos de soja, trazendo notoriedade para esse campo (Döbereiner, 1966). A soja e seus derivados representaram aproximadamente 14,10% de toda a exportação brasileira, isto é, US\$ 30,69 bilhões. (CONAB, 2017), e seu cultivo não utiliza fertilização nitrogenada, representando uma redução de custos e de impactos ambientais.

Com o avanço de pesquisas científicas, que buscam o entendimento do funcionamento das comunidades microbianas do solo e da relação simbiótica de plantas com os micro-organismos, tem-se aumentado as possibilidades de gerar novas ferramentas biotecnológicas (Cho et al, 2018; Fonseca et al., 2018; Proença et al., 2017).

A comunidade microbiana do solo (CMS) é intimamente relacionada à ciclagem de nutrientes, e mudanças em sua estrutura podem influenciar no equilíbrio químico do solo e interferir diretamente na produtividade vegetal (Chaparro et al., 2012). Entretanto, dada a megadiversidade encontrada nos microbiomas dos solos, a forma como as CMS se estruturam ainda é de difícil entendimento. Nesse sentido, trabalhos que analisem, em condições controladas, a influência de diferentes fatores químicos e biológicos na modulação dessas comunidades são de grande interesse.

### 1.1. O solo

O solo é a camada de material mais frouxa e externa da superfície da Terra e distinta do leito rochoso. O solo é formado após longos períodos de tempo nos quais as interações complexas entre materiais parentais (rochas, sedimentos), topografia, clima e organismos produzem os solos em suas mais diversas características. Em uma larga escala, solos são classificados como minerais e orgânicos, dependendo de como se deu sua origem (Madigan et al., 2016). Contudo, a classificação em suas diferentes classes é bem mais complexa e somente no Brasil, há 13 classes de solos diferentes (Quadro 1) (Santos et al., 2006).

**Quadro 1** - Principais classes de solos brasileiros, até o segundo nível de classificação. (Adaptado de Santos et al., 2006)

Argissolos	Neossolos
Cambissolos	Nitossolos
Chernossolos	Organossolos
Espodossolos	Planossolos
Gleissolos	Plintossolos
Latosolos	Vertissolos
Luvissolos	

Os materiais particulados (argila, silte e areia), oriundos do processo de pedogênese, se estruturam fisicamente na forma de agregados do solo. Estes agregados são formados pela orientação, atração e interação das partículas entre si com os micro-organismos do solo, e com as substâncias agregativas liberadas por micro-organismos e plantas (Dexter, 1988; Emerson, 1959; Harris et al., 1963).

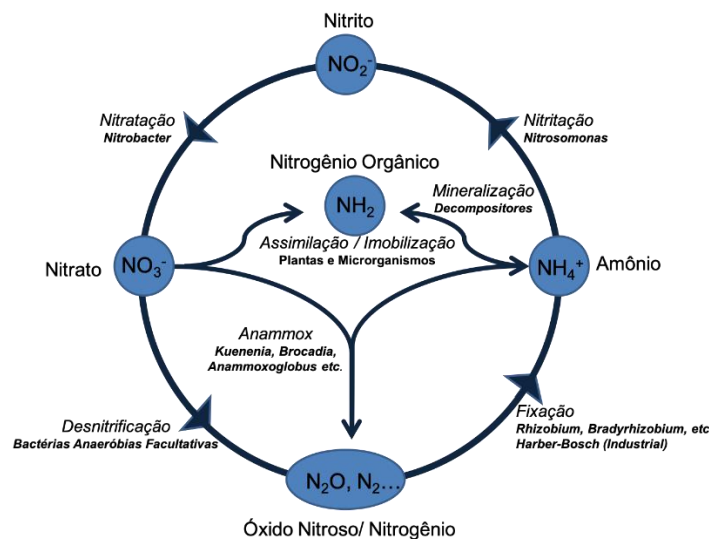
Os agregados são importantes elementos da física do solo, influenciando sua estabilidade, porosidade e densidade. Eles agem ainda na estabilização e manutenção da matéria orgânica do solo (MOS), através do aprisionamento da mesma nos espaços internos dos agregados, onde eles ficam protegidos da degradação microbiana (Chotte, 2015; Dexter, 1988). Além disso, os agregados são essenciais na formação de microambientes, que favorecem a criação de nichos ecológicos específicos, e portanto, na estruturação de uma comunidade microbiana mais diversa (Wang et al., 2018).

Enquanto, sob o ponto de vista macro ecológico, um solo aparenta ser altamente homogêneo, sob o ponto de vista microbiológico ele deve ser entendido como uma matriz física altamente heterogênea (Cotta, 2016). Para efeito de comparação de escala, para uma bactéria

de 3  $\mu\text{m}$ , o espaço de 1 cm é equivalente ao espaço de 6 km para uma pessoa de 1,80 m de altura. Assim sendo, o espaço de alguns centímetros corresponde a uma infinidade de microambientes para um procarionto. Cada um dos microambientes pode apresentar uma particularidade, exercendo uma pressão seletiva diferente, o que mantém comunidades microbianas distintas (Bach et al., 2018). Tal particularidade faz com que o solo tenha a mais alta diversidade do planeta (Thompson et al., 2017; Torsvik, Goksøyr, & Daae, 1990).

O solo também é um grande reservatório de importantes elementos químicos. Dentre as transformações biogeoquímicas que tem ocorrência no solo, destacam-se os ciclos do nitrogênio (N), carbono (C) e do fósforo (P).

O nitrogênio tem grande importância para todos os seres vivos, uma vez que é um dos elementos constituintes das proteínas e outras moléculas orgânicas. O N é, normalmente, o principal elemento limitante da produtividade vegetal (Leghari et al., 2016). A ciclagem no N tem a participação direta dos micro-organismos. De forma simplificada, as principais transformações do N em solos contemplam o processo de fixação biológica de nitrogênio, assimilação, mineralização, nitrificação e desnitrificação (Figura 1) (Madigan et al., 2016).



**Figura 1** – Ciclo do Nitrogênio, com suas transformações e exemplos de micro-organismos envolvidos (Rachid, 2010).

Como exemplo do protagonismo microbiano neste ciclo, há o processo de fixação biológica do N, feito por bactérias do gênero *Rizhobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Frankia* e outros; a nitrificação por bactérias do gênero *Nitrobacter* e *Nitrosomonas*; e o processo de desnitrificação por bactérias e fungos de diferentes taxons (Hayatsu, Tago e Saito, 2008).

O fósforo é importante tanto quanto o nitrogênio para o crescimento vegetal. Ele participa do metabolismo energético dos seres vivos, na produção de ATP, na fotossíntese e respiração, e ainda na síntese de ácidos nucleicos, membranas celulares (Raghothama, 1999). O fósforo pode estar presente de duas maneiras no solo, na forma orgânica, majoritariamente como fitato, ou inorgânica, como fosfatos. As plantas só conseguem assimilar o fósforo solúvel, que é encontrado em pequena quantidade no solo. Isso porque os íons de fosfato interagem fortemente com estruturas coloidais do solo, como íons de alumínio e ferro, muito abundantes em solos em todo mundo (Raghothama, 1999). Para que o P esteja disponível para as plantas, é essencial a participação dos processos microbianos, seja pela mineralização do fosfato orgânico ou pela solubilização do fosfato inorgânico, mediada por bactérias e fungos (Gul e Whalen, 2016; Lang et al., 2016).

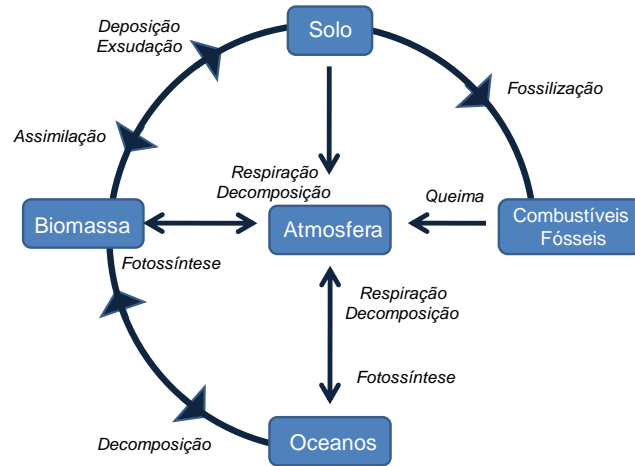
Por fim, destaca-se a ciclagem de carbono que acontece, em parte, no solo (Figura 2). As transformações químicas que envolvem este elemento podem ser mediadas por macro e micro-organismos. Apesar do C ser um nutriente para o crescimento e desenvolvimento vegetal, ele é muito importante para a manutenção da atividade microbiana do solo, e interfere diretamente nos demais ciclos biogeoquímicos, uma vez que o carbono biodisponibilizado nutre a comunidade bacteriana. O C está presente no solo em diferentes formas orgânicas e inorgânicas. O carbono orgânico é o que tem maior relevância sob o ponto de vista do metabolismo do solo, e ele pode estar presente em formas lábeis incluindo carboidratos, lipídeos e até mesmo micro-organismos vivos, ou em formas recalcitrantes tais como ácidos húmicos e fúlvicos (Cotta, 2016).

A matéria orgânica do solo (MOS) compreende uma das principais formas de C presentes no solo, derivados de organismos vivos ou mortos, resíduos de plantas e animais em decomposição, assim como formas orgânicas de nitrogênio e outros elementos. A composição da MOS é bastante complexa, devido aos diferentes compostos e processos que a formam, como processos de humificação e decomposição que ocorrem no solo (Cardoso et al., 1992; Cotta, 2016

). A MOS é importante uma vez que está relacionada à capacidade do solo em manter a produtividade e a atividade biológica (Cotta, 2016).

A biomassa microbiana compreende toda a soma de carbonos derivados dos micro-organismos sendo uma das fontes de carbono para a formação da MOS, (Stevenson, 1994). Desta porção de C, grande parte dela é provenientes de fungos, apesar do número superior de

células bacterianas presente no solo (Rasche e Cadisch, 2013). Além disso, é a forma de carbono que fica disponível de maneira mais rápida no sistema.



**Figura 2** – Ciclo do Carbono (Rachid, 2010)

## 1.2. Microbiologia dos solos

Como previamente abordado, os solos abrigam a maior biodiversidade microbiana do planeta (Thompson et al., 2017). Segundo estimativas, o número de células procarióticas em um grama de solo a uma profundidade de 1 m é  $4 \times 10^7$  (Whitman, Coleman, e Wiebe, 1998), enquanto o número de cópias do gene que codifica para a subunidade 16S rRNA, um marcador molecular para estudos de procariotos, pode variar entre  $10^7$  a  $10^{10}$  cópias por g de solo (Cuer et al., 2018; Rachid et al., 2013). Destes, estima-se que a proporção de bactérias e fungos superam em  $10^2$  a  $10^4$  a proporção de protistas e arqueas (Fierer, 2017). A identificação de cada um destes micro-organismos é dificultada, uma vez que poucos destes são cultiváveis e, além disso, não possuem sequências de DNA em bancos de dados (Thompson et al., 2017).

Os micro-organismos associados ao solo tem um papel essencial nas transformações biogeoquímicas. Estima-se que cerca de 80-90% dos ciclos biogeoquímicos tenham participação da microbiota do solo como mediadora (Coleman e Crossley, 1996; Nannipieri et al., 2003). Bactérias, arqueias e fungos associados ao solo e às plantas compõem uma complexa rede biológica responsável pela renovação de nutrientes e pela saúde do solo. Mudanças na comunidade microbiana, portanto, poderiam levar a mudanças no equilíbrio de nutrientes no solo, que por sua vez refletiriam na produtividade vegetal (Chaparro et al., 2012; Van Der Heijden, Bardgett, e Van Straalen, 2008).

As comunidades microbianas sofrem influências de diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos. Estes fatores, conhecidos como moduladores, podem ser classificados como

abióticos, que compreende a ação do pH (Cho, Kim, e Lee, 2016; Fierer e Jackson, 2006; Fierer, 2017), da salinidade (De León-Lorenzana et al., 2018; Fierer, 2017; Lozupone e Knight, 2007), da temperatura (Fierer, 2017; Jin e Kirk, 2018) da disponibilidade de matéria orgânica (Ding et al., 2015; Fierer, 2017) e da atmosfera entre outros.

Fatores bióticos também atuam sobre estas comunidades, albergando a cobertura vegetal (Eisenhauer et al., 2010; Lamb, Kennedy e Siciliano, 2011; Leff et al., 2018) e a interação microbiana (Deveau et al., 2018; Stubbendieck, Vargas-Bautista e Straight, 2016)

Estes fatores podem atuar tanto em microhabitats, ou seja, no interior de agregados e sítios específicos, ou de maneira mais ampla, como por exemplo, na região rizosférica (Allen e Schlesinger, 2004). A rizosfera compreende regiões próximas das raízes das plantas, e que sofrem a influência da mesma. Neste local, a planta libera seus exsudatos, normalmente carboidratos e glicoproteínas, atraindo micro-organismos e formando assim uma comunidade microbiana diferente da microbiota presente no restante do solo. Nesta região, encontram-se as mais ricas e abundantes comunidades microbianas (Singh et al, 2004; Thompson et al., 2017).

A presença destes fatores abióticos e bióticos é responsável pela ampla diversidade microbiana presente no solo. O que influencia, na forma de pressão ambiental, o favorecimento de determinado filo bacteriano ou grupo bacteriano (Oliverio, Bradford e Fierer, 2017).

. Todos estes fatores atuam em conjunto modificando as comunidades ao longo do tempo (Allen e Schlesinger, 2004). Dentre os fatores citados acima, dois deles merecem destaque: o pH e a cobertura vegetal.

### **1.3. pH**

Nos últimos anos, vários estudos mostraram que o pH é o principal fator que modula a diversidade alfa e a composição da comunidade nos solos, afetando especialmente os filos Acidobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes (Chu et al., 2010; Fierer et al., 2005; Jones et al., 2009).

Fierer e Jackson (2006) descreveram a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana analisando amostras de diversos biomas do planeta. Eles demonstraram que conforme ocorria um aumento do pH, também ocorria um aumento desses dois indicadores. Tal aumento ocorria até um pH próximo a faixa neutra, seguida de certa diminuição nas faixas mais básicas. No mesmo estudo, mostraram que não havia um padrão em relação aos biomas, ficando clara a influência do pH sobre a riqueza e a diversidade bacteriana.

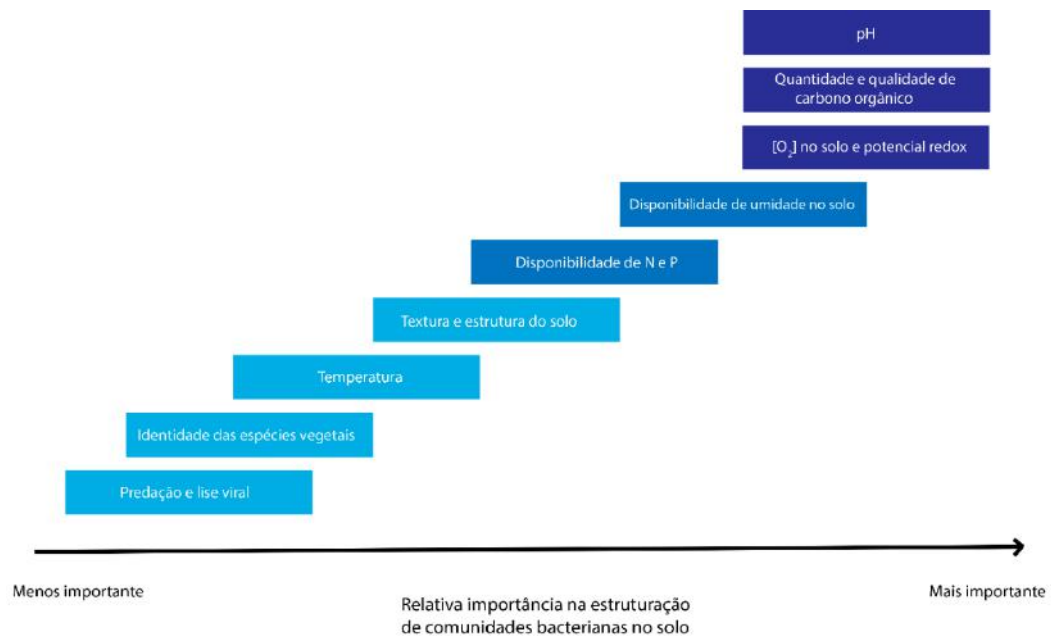


Chu e colaboradores (2010) compararam a comunidade bacteriana do ártico e relacionaram com comunidades microbianas de diversos locais. Eles demonstraram que não havia um padrão de comunidade baseado em regiões geográficas, e que a comunidade do ártico era composicionalmente tão diversa quanto qualquer outra do planeta. Entretanto, ao correlacionar as amostras em função do pH, eles demonstraram que as composições seguiram um padrão em função do pH e que esse era o grande modulador das comunidades .

Uma forte correlação entre a riqueza de espécies e pH também foi demonstrada por Thompson e colaboradores (2017), em um esforço global que contou com o sequenciamento de quase 30 mil amostras de diversos ambientes.

Todos esses trabalhos apresentaram uma forte caracterização de como a comunidade microbiana e o pH do solo estão intimamente ligados. Apesar das evidências sólidas, esses estudos analisaram os dados de uma perspectiva bioma / paisagem. Essa abordagem tem um problema intrínseco. Ele agrupa diferentes composições de plantas na mesma categoria (por exemplo, ao tratar pastagens como algo único). Em recente revisão, Fierer (2017) ordena como todos esses fatores influenciam a comunidade microbiana, e estabelece que o tipo de planta é um dos fatores que menor efeito exerce (Figura 3).

Entretanto, dados robustos obtidos em outros modelos experimentais contradizem essa baixa influência, como será abordado a seguir.



**Figura 3** – Ordenação de diferentes fatores ambientais em ordem de influência, sobre a comunidade microbiana (Adaptado Fierer, 2017).

#### 1.4.Cobertura vegetal

Um outro fator que também é amplamente estudado é a ação da cobertura vegetal sobre a comunidade microbiana do solo. Estudos mostram uma influência marcante da composição de espécies vegetais sobre a comunidade microbiana, incluindo mudanças na estrutura da comunidade de bactérias e fungos e abundância de genes do ciclo do nitrogênio (*amoA* de arquea e *nirK*) (Rachid et al., 2013; Rachid et al., 2015).

Berg e Smalla (2009) explicam que a comunidade bacteriana sofre forte influência das plantas, pois cada planta é colonizada por um conjunto de micro-organismos específicos, e portanto, a espécie vegetal e o tipo de solo vão modular conjuntamente a comunidade bacteriana do solo.

Mitchell e colaboradores (2010) avaliaram cinco áreas em um gradiente que abrangia de arbustos a florestas decíduas para entender se a composição vegetal ou a química do solo eram os melhores preditores da comunidade do solo. Eles concluíram que a composição vegetal é um preditor ao menos tão bom quanto a química do solo.

Estudos de Rachid e colaboradores (2013) analisaram a estruturação das comunidades microbianas em plantios monoculturais e mistos de Acácia e Eucalipto. O sistema funcionou com um modelo ecológico, replicado em escala de campo, onde havia sítios com espécies isoladas de plantas, assim como elas em conjunto. Eles demonstraram que cada monocultivo apresentava uma comunidade microbiana específica e bem diferente uma da outra, especialmente em relação à comunidade de fungos. Mais que isso, demonstraram que nos plantios com as duas espécies havia uma integração das comunidades, demonstrando assim a influência da cobertura vegetal sobre a comunidade microbiana.

Burns e colaboradores (2015) analisaram o solo rizosférico e não rizosférico de diferentes angiospermas em uma mesma reserva florestal, observando diferentes fatores como composição vegetal, composição química do solo e distância espacial. Ao fim, analisando a estruturação da comunidade bacteriana e fúngica, puderam concluir que o principal fator que influenciou as comunidades foi a composição da cobertura vegetal. Leff e colaboradores (2015) demonstraram em comunidades microbianas do solo de pradarias, que a mudança na composição das comunidades de plantas era significativamente correlacionada com as alterações nas mudanças da composição da comunidade de fungos e bactérias. Já Prober e colaboradores (2015) mostraram em um estudo com 145 amostras de 25 pradarias que a diversidade de plantas é um excelente preditor de diversidade microbiana beta.

Como demonstrado, a influência dos principais moduladores das comunidades microbianas do solo permanece em grande debate. Para melhor entender esse sistema, estudos com isolamento dos moduladores e interação a interação dos mesmos, de maneira que seja possível determinar relações de causa e efeito, são necessários. Dessa forma, este trabalho se propõe a analisar a influência do pH e da cobertura vegetal em um sistema experimental controlado.

## 2. JUSTIFICATIVA

Diante de um levantamento bibliográfico apurado, não há como apontar uma relação de causa e efeito entre os principais moduladores conhecidos da comunidade microbiana, uma vez que as observações sobre este fenômeno foram realizadas em sistemas já estabelecidos. Vislumbrando um futuro manejo da microbiota do solo e tendo em vista a necessidade de entender melhor a relação entre a biologia e a química do solo, esse estudo se propõe a entender, em condições controladas, o efeito de dois dos principais moduladores microbianos conhecidos, o pH e a cobertura vegetal do solo.

As hipóteses definidas são: Tanto o pH quanto a cobertura vegetal interferem na estrutura da comunidade bacteriana.

Alguns grupos bacterianos são mais sensíveis que outros em relação ao impacto do pH e da cobertura vegetal, podendo responder apenas a um deles, ou a nenhum deles, ou até mesmo aos dois.

Para testar as hipóteses levantadas, utilizou-se neste trabalho quatro faixas de pH e dois tipos diferentes de plantas, milho e feijão. O uso destas plantas se justificam pelos seus diferentes metabolismos e diferentes disposições de raízes.

### 3. OBJETIVO

Avaliar o grau de influência do pH e da cobertura vegetal como moduladores da comunidade microbiana do solo.

#### 3.1. Etapas desenvolvidas:

- Coletar um solo com pH ácido
- Estabelecer uma curva de dose x resposta entre quantidade de carbonato de cálcio e variação no pH de um solo.
- Estabelecer um sistema controlado compreendendo vasos com solos em quatro variações de pH e dois tipos de plantas distintas, incubando por 90 dias.
- Medir o pH dos solos após a incubação
- Caracterizar a fertilidade dos solos
- Extrair o DNA do solo rizosférico
- Sequenciar o gene que codifica para a subunidade 16S do rRNA
- Definir a riqueza, diversidade, composição e estrutura da comunidade bacteriana
- Correlacionar os dados da comunidade bacteriana com os dados da biomassa vegetal e com as propriedades químicas do solo.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Caracterização inicial do solo.

Para a execução do experimento foi necessário obter amostras de um solo homogêneo e com pH baixo, pois é mais fácil ajustar o pH para uma condição mais alcalina, que para uma condição mais ácida. Assim, uma busca por amostras de solos de diferentes locais do campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) foi feita, e o pH de cada solo foi definido em água de acordo com Manual de Métodos de Análise de Solo da Embrapa (EMBRAPA, 1997).

O solo selecionado para a execução do experimento foi peneirado com uma peneira de 2 mm, com intuito de se retirar quaisquer tipos de detritos. E foi então submetido a um teste de determinação da capacidade de campo pelo método de tubo, descrito por Costa, Nanni e Jeske (1997).

Neste teste, o solo é colocado em compartimentos abertos nas duas extremidades e com volume conhecido, e em uma das extremidades é colocada uma tela que serve de suporte para o solo. Após ser preenchido pelo solo, o aparato foi submerso em água, durante 24h para que fique completamente úmido.

Após a drenagem, a massa úmida do solo foi determinada e em seguida foi posta em uma estufa de secagem, para que o solo fique completamente seco e a massa seja novamente determinada. O peso da massa seca foi subtraído do peso da massa úmida, e o resultado definiu a quantidade de água que o solo é capaz de reter. Este teste foi importante para definir a quantidade de água que o solo deveria receber para estabelecimento da curva dose-resposta.



**Figura 4** – Tubos de PVC utilizados para avaliação da capacidade de campo do solo.

#### **4.2.Determinação da curva de dose de CaCO<sub>3</sub> x pH do solo**

Para a construção do experimento controlado foi necessário entender a reação do solo ao CaCO<sub>3</sub> utilizado para o ajuste do pH. Para tanto, se fez necessário estabelecer uma curva de dose de CaCO<sub>3</sub> X resposta do pH. O teste foi realizado conforme as especificações do Manual de Calagem e Adubação do estado do Rio de Janeiro (Freire et al., 2013). Os cálculos utilizados neste experimento são apresentados no anexo I.

Partindo do pH inicial do solo, utilizou-se especificações contidas no Manual para a correção do pH de um solo arenoso com CaCO<sub>3</sub>. Com base nestas especificações foram escolhidas determinadas dosagens para a construção da curva.

Neste teste, 200g de solo foram acondicionados em copos de 600ml e adicionados das seguintes doses de CaCO<sub>3</sub>: 0mg, 37mg, 110mg, 438mg e 657mg. Os potes foram mantidos a 70% da capacidade de campo, sendo todas as quatro doses testadas em quadruplicata.

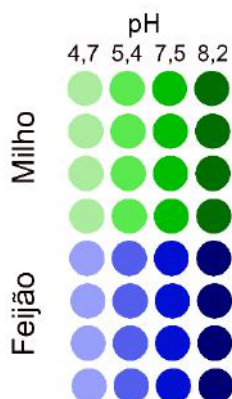
Após estabelecer este microcosmo, o pH foi medido diariamente durante duas semanas ou até atingir a estabilidade. Ao fim, os dados foram compilados e utilizados para montar uma curva polinomial, que orientou a dose de CaCO<sub>3</sub> a ser utilizada no estabelecimento das faixas de pH na montagem do mesocosmo.

#### **4.3.Montagem e monitoramento do experimento em casa de vegetação.**

Em vasos, seguindo as informações obtidas da curva dose x resposta, foram estabelecidos oito tratamentos, consistindo em um experimento fatorial com 4 faixas de pH e duas coberturas vegetais (Figura 5), estabelecidos com 4 repetições (total de 32 vasos). Para a correção do pH, foram adicionadas as seguintes quantidades de CaCO<sub>3</sub> em cada vaso: faixa 1 0g, (solo *in natura*), a faixa 2 recebeu 0,2187g por Kg de solo; a faixa 3 recebeu 1,2407g por Kg de solo e na faixa 4 de 3,978g por Kg de solo. Na faixa 1 não foi inserido CaCO<sub>3</sub> uma vez que esta faixa manteria o pH original do solo.

O solo ainda foi corrigido para alguns nutrientes, dentre eles, potássio, fósforo, nitrogênio, magnésio e cálcio. Para isso foram utilizadas as substâncias, fosfato de potássio, fosfato de sódio, uréia, óxido de magnésio e carbonato de cálcio, respectivamente.

Tais elementos estavam ausentes ou em baixa concentração no solo, e foram adicionados conforme a Tabela 1. Cada faixa de pH recebeu uma quantidade específica, pois a disponibilização biológica de cada nutriente é dependente do pH. Portanto, para que todos tivessem uma mesma disponibilidade, houve a necessidade de ajuste.



**Figura 5** – Croqui experimental dos vasos por tipo de planta e valor de pH

O solo foi corrigido de acordo com o Manual de adubação e calagem do estado do Rio de Janeiro, a quantidade de cálcio a ser adicionada seguiu a proporção ideal para o cultivo de arroz também descrito no manual. Após o processo, o solo foi dividido em porções de 4 Kg por vaso. Os cálculos utilizados neste experimento estão presentes no anexo II.

**Tabela 1** – Quantidades de nutrientes ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de solo adicionadas em cada faixa.

	Faixa 1	Faixa 2	Faixa 3	Faixa 4
Fosfato de Potássio	0.34	0.34	0.34	0.34
Fosfato de Sódio	0.16	0.16	0.16	0.16
Uréia	0.626	0.626	0.626	0.626
Óxido de Magnésio	-	0.25	1.375	4.625
Carbonato de Cálcio	-	0,217	1,2407	3,9778
Micronutrientes	0.8	0.8	0.8	0.8

Seguindo a divisão do solo e correção do pH, os vasos foram aclimatados por cerca de um mês para estabilização do pH. Verificada a estabilização, foi iniciado o plantio das sementes de milho e feijão. Cada vaso recebeu 4 sementes, que, após germinarem, sofreram o desbaste para a manutenção de 2 plantas por vaso. Os vasos foram distribuídos de maneira inteiramente aleatória em uma bancada da casa de vegetação.

O experimento em casa de vegetação teve aproximadamente 3 meses de duração após o plantio. Ao final do experimento, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea, sendo secas em estufa a 50 °C por 72h e pesadas para determinação da biomassa. A caracterização da fertilidade e pH final do solo foi feita como previamente descrito.



#### 4.4 Análises microbiológicas.

A análise microbiológica das amostras foi feita a partir de metodologia independente de cultivo. O procedimento iniciou na extração do DNA total de, aproximadamente, 500mg das amostras de solo rizosférico. Para isso, foi utilizado o kit de extração de DNA total de solos, FastDNA® Spin kit for Soil (Bio 101, CA, EUA), com o auxílio do equipamento FastPrep®, de acordo com as normas do equipamento.

O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit (Life Technologies, Grand Island, NY), submetido a uma reação de PCR para seleção da região V4 do gene que codifica o 16S rRNA, utilizando os iniciadores 515FB (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806RB (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) e sequenciado em *paired-end* com a utilização do aparelho Illumina MiSeq® seguindo os procedimentos padrão do fabricante, no Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4.4. Análises de bioinformática

As sequências obtidas foram processadas através de análises de bioinformática com a utilização do programa Mothur (Schloss et al., 2009). As sequências de ambas as extremidades foram unidas com o comando *make.contigs*, adicionando a lista de iniciadores, *barcodes* e com os parâmetros *checkorient=T*, *pdiffs=1*. As sequências foram avaliadas com o comando *screen.seqs*, removendo sequências com qualquer ambiguidade (*maxambig=0*), com muitos homopolímeros (*maxhomop=8*), leituras curtas e muito longas (*minlength=450*, *maxlength=550*).

As sequências foram então alinhadas com o comando *align.seqs*, usando o banco de dados Silva modificado (através de uma PCR virtual com os mesmos iniciadores das amostras, com o comando *pcr.seqs*) como referência (Quast et al., 2003) e o alinhamento resultante foi submetido a uma nova avaliação com os comandos *screen.seqs* e *filter.seqs* para remover sequências mal alinhadas e as colunas não informativas do alinhamento. As sequências foram pré-agrupadas usando o comando *pre.cluster* com o parâmetro *diffs=4*. As quimeras foram detectadas com o comando *chimera.vsearch* e, em seguida, eliminadas. As sequências foram classificadas usando o comando *classify.seqs*, com o banco de dados RDP (Cole et al., 2009) como referência e um ponto de corte inicial de 80 para o *bootstrap*. As sequências classificadas em cloroplastos, mitocôndrias, Eukarya, Archaea e aquelas não atribuídas a nenhum reino

foram removidas. as sequências resultantes foram usadas como entrada para o comando *cluster.split*, usando *splitmethod=fasta* e *taxlevel= 4*. Agrupou-se todas as sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), com um ponto de corte de 3% de dissimilaridade. As sequências foram posteriormente filtradas para remover *singletons*.

#### 4.5. Análises estatísticas dos dados

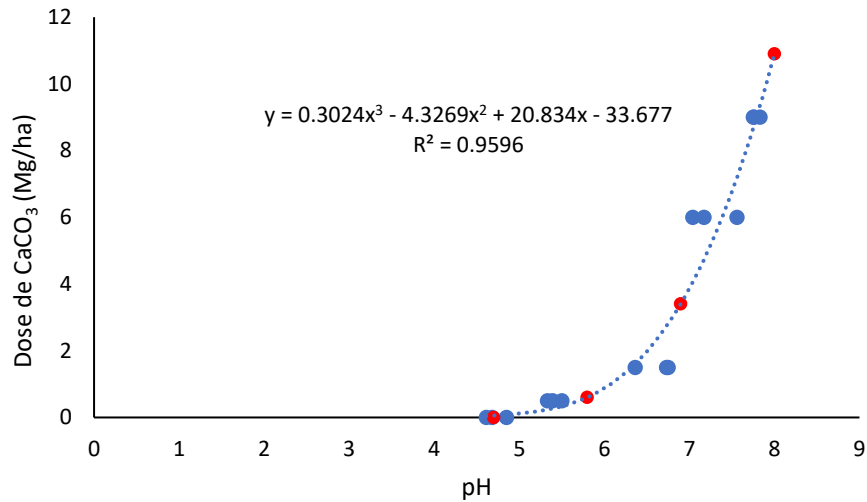
Todos os dados foram testados com relação as suas normalidades e homocedasticidade. Os que foram aprovados nestes testes passaram por uma análise de variância, seguido de um teste de Tukey com o objetivo de se diferenciar as médias. Já os que não apresentaram normalidade passaram por uma transformação e foram realizados testes de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney.

Para analisar de qual forma os filós eram influenciados pelas alterações do pH, foi utilizada uma correlação de Spearman. Para observar o comportamento dos principais filós frente aos fatores determinados, foram realizadas modelagens polinomiais baseadas no índice de Akaike para obter a melhor representatividade (Burnham e Anderson, 2002).

Para entender a estrutura da comunidade e sua relação com os fatores abióticos, a tabela de distribuição de OTUs foi ordenada através de uma análise multidimensional não métrica, utilizando a distância de Bray-Curtis com o programa Past3 (Hammer, Harper e Ryan, 2001) e sobreposta à uma matriz com dados físico-químicos, como pH em KCl, fósforo assimilável, carbono orgânico, relação carbono nitrogênio, soma das bases e biomassa de raiz. A diferenciação entre os tratamentos foi feita a partir de uma MRPP (do inglês *Multi Response Permutation Procedure*) de duas vias e a quantificação do grau de influência se deu através da avaliação das médias das variâncias, obtidas nesta análise, realizadas no programa R (R Core Team, 2015).

## 5. RESULTADOS

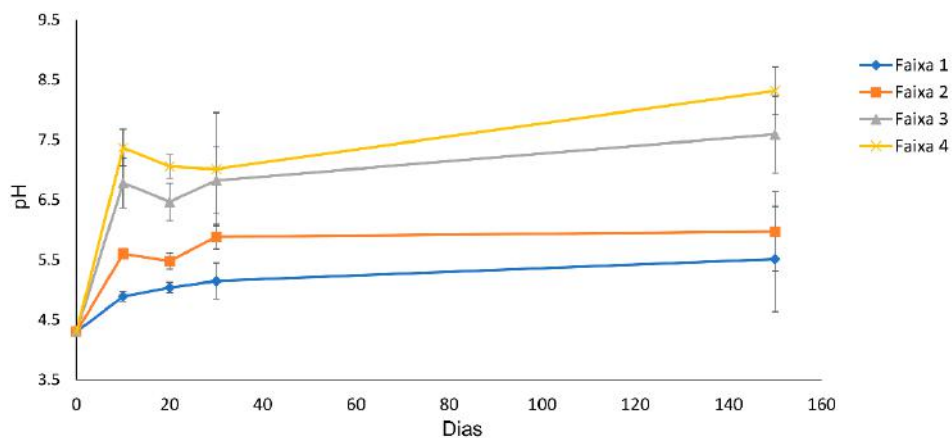
O experimento de determinação da resposta do solo frente a diferentes concentrações de  $\text{CaCO}_3$  revelou uma curva exponencial na qual quantidades muito grandes de  $\text{CaCO}_3$  precisam ser adicionadas para atingir as faixas de pH mais elevadas (Figura 6).



**Figura 6** – Curva dose de  $\text{CaCO}_3$  e resposta do pH, indicando a quantidade de  $\text{CaCO}_3$ , em Mg/há ( $10^6\text{g/ha}$ ), para se atingir determinada faixa de pH. Em azul os valores obtidos no teste, e em vermelho as quatro faixas que foram definidas a serem utilizadas em experimento posterior.

A partir da modelagem dos dados obtidos nesse experimento, chegou-se à uma equação polinomial de grau 3 (Figura 6) pela qual foi possível estabelecer as doses a serem adicionadas aos vasos no experimento em casa de vegetação.

Em casa de vegetação, o pH dos solos atingiu os valores desejados a partir do décimo dia de incubação, como verificado na figura 7, com pequenas flutuações.



**Figura 7** – Comportamento do pH durante o experimento a partir da adição de  $\text{CaCO}_3$  até a interrupção do experimento, um período de 150 dias. O gráfico demonstra a estabilização do pH e a manutenção das faixas de pH durante o experimento.

**Tabela 3** – Análises físico-químicas das amostras de solo após o experimento, com os valores médios de cada faixa e seus desvios-padrão.

	Milho				Feijão			
	Faixa 1	Faixa 2	Faixa 3	Faixa 4	Faixa 1	Faixa 2	Faixa 3	Faixa 4
pH KCl 1N	4,70 (0,10)	5,17 (0,13)	7,50 (0,12)	8,22 (0,05)	4,70 (0,22)	5,58 (0,05)	7,60 (0,08)	8,18 (0,15)
Ca <sup>2+</sup>	0,60 (0,05)	0,88 (0,05)	1,80 (0,18)	1,52 (0,10)	0,60 (0,08)	0,82 (0,10)	1,52 (0,10)	1,47 (0,10)
Mg <sup>2+</sup>	0,60 (0,05)	0,75 (0,30)	0,22 (0,05)	0,70 (0,14)	0,60 (0,08)	0,72 (0,29)	0,35 (0,06)	0,65 (0,06)
K <sup>+</sup>	0,04 (0,01)	0,02 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	0,04 (0,01)	0,03 (0,01)	0,05 (0,02)	0,04 (0,01)
Na <sup>+</sup>	0,07 (0,01)	0,06 (0,03)	0,05 (0,01)	0,06 (0,01)	0,07 (0,08)	0,08 (0,08)	0,09 (0,17)	0,08 (0,05)
Valor S	0,70 (0,05)	1,02 (0,13)	2,08 (0,17)	2,32 (0,21)	0,70 (0,08)	1,00 (0,08)	2,02 (0,17)	2,22 (0,05)
Al <sup>3+</sup>	0,05 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,05 (0,06)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
H <sup>+</sup>	1,22 (0,13)	1,05 (0,19)	0,20 (0,14)	0,00 (0,00)	1,22 (0,10)	0,75 (0,21)	0,28 (0,14)	0,00 (0,00)
Valor T	1,98 (0,08)	2,08 (0,19)	2,28 (0,30)	2,32 (0,21)	1,98 (0,10)	1,8 (0,21)	2,30 (0,14)	2,22 (0,05)
P assimilável (mg/kg)	15,75 (1,26)	7,75 (0,96)	16,25 (0,50)	23,75 (3,50)	15,75 (1,89)	15,25 (3,10)	25,75 (2,50)	27,75 (2,36)
C (orgânico) (g/kg)	2,30 (0,50)	2,68 (0,61)	2,52 (0,26)	2,55 (0,42)	2,30 (0,14)	2,25 (0,06)	2,52 (0,05)	2,22 (0,10)
N (g/Kg)	0,33 (0,06)	0,40 (0,08)	0,35 (0,06)	0,33 (0,10)	0,33 (0,05)	0,33 (0,05)	0,38 (0,05)	0,38 (0,05)
C/N	7,00 (1,89)	6,50 (1,29)	7,30 (0,96)	8,00 (1,41)	7,00 (0,82)	7,00 (0,82)	6,50 (1,00)	6,00 (0,82)
100.Na+/T (%)	3,50 (0,50)	2,60 (1,71)	2,30 (0,50)	2,50 (0,58)	3,50 (0,58)	4,50 (0,58)	3,50 (0,58)	3,80 (1,50)

Valor S - Soma das bases trocáveis

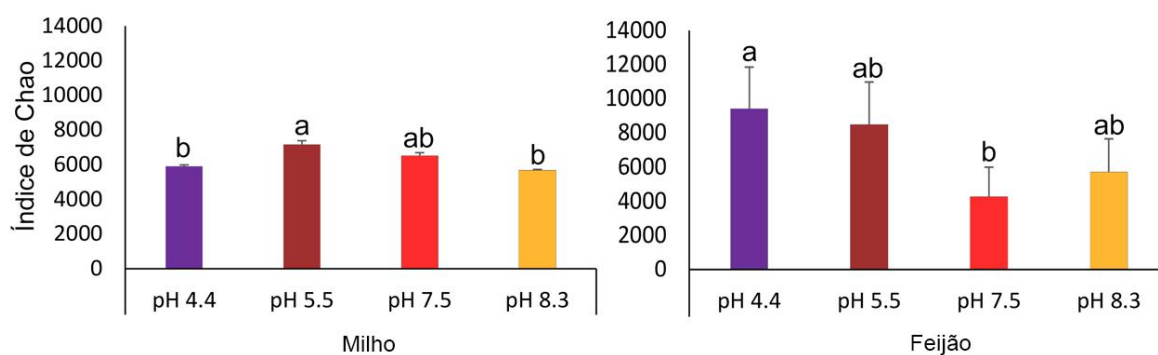
Valor T - Capacidade de troca de cátions(CTC)

100.Na+/T - Saturação de sódio

Em relação à caracterização da fertilidade, referente aos três principais elementos carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), verificou-se que os valores de C e N se mantiveram similares em todos os tratamentos. Contudo os valores de P são maiores em valores de pH mais altos, o que é explicável uma vez que os compostos fosfatados são mais solúveis em solos com valores de pH mais altos (tabela 3).

Quanto às análises microbiológica, observou-se que houve influência significativa (ANOVA de duas vias,  $p < 0.05$ ) do pH sobre a  $\alpha$ -diversidade das amostras, representada pelo índice de Chao (Figura 7). O mesmo efeito foi observado para o número de OTUs e índice de Shannon (dados não mostrados). Apesar de não haver uma influência direta da planta, a ANOVA de duas vias executada em relação aos indicadores  $\alpha$ -diversidade apresentou interação significativa entre os fatores pH x tipo de planta ( $p < 0,05$ ), isto é, o tipo de resposta do pH depende do tipo de planta presente na amostra.

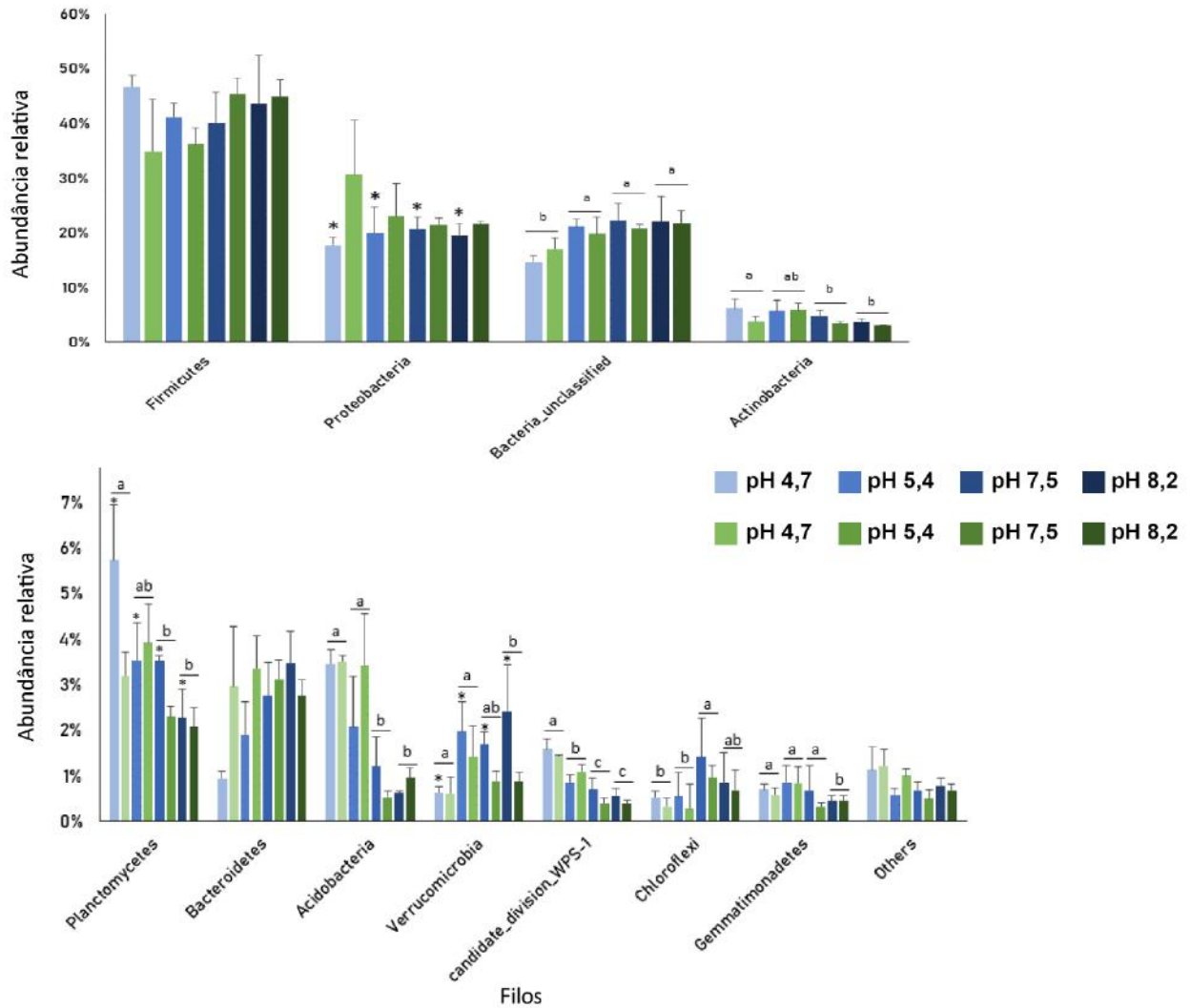
O pH atuou aumentando o número de indivíduos nas faixas mais extremas e diminuindo nas faixas mais intermediárias para as plantas de milho. Já o inverso ocorreu para as plantas de feijão, aumentando nas faixas intermediárias e diminuindo nas faixas mais extremas.



**Figura 7** – Índice de Chao ( $\alpha$ -diversidade) para cada tipo de planta e faixa de pH. Na figura se observa a influência do pH sobre a comunidades de ambas as plantas, além disso demonstra a influência da interação planta+pH nestas comunidades.

Com relação a abundância dos filos (Figura 8), obtida através da comparação das sequências com bancos de dados, observou-se um predomínio dos filos Firmicutes, Proteobacteria, e Actinobacteria. Sendo seguidos de Planctomycetes, Bacteroidetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Candidate division WPS-1, Chloroflexi e Gemmatimonadetes entre outros. Aproximadamente 20% de todas as sequências não foram classificadas dentro de nenhum filo.

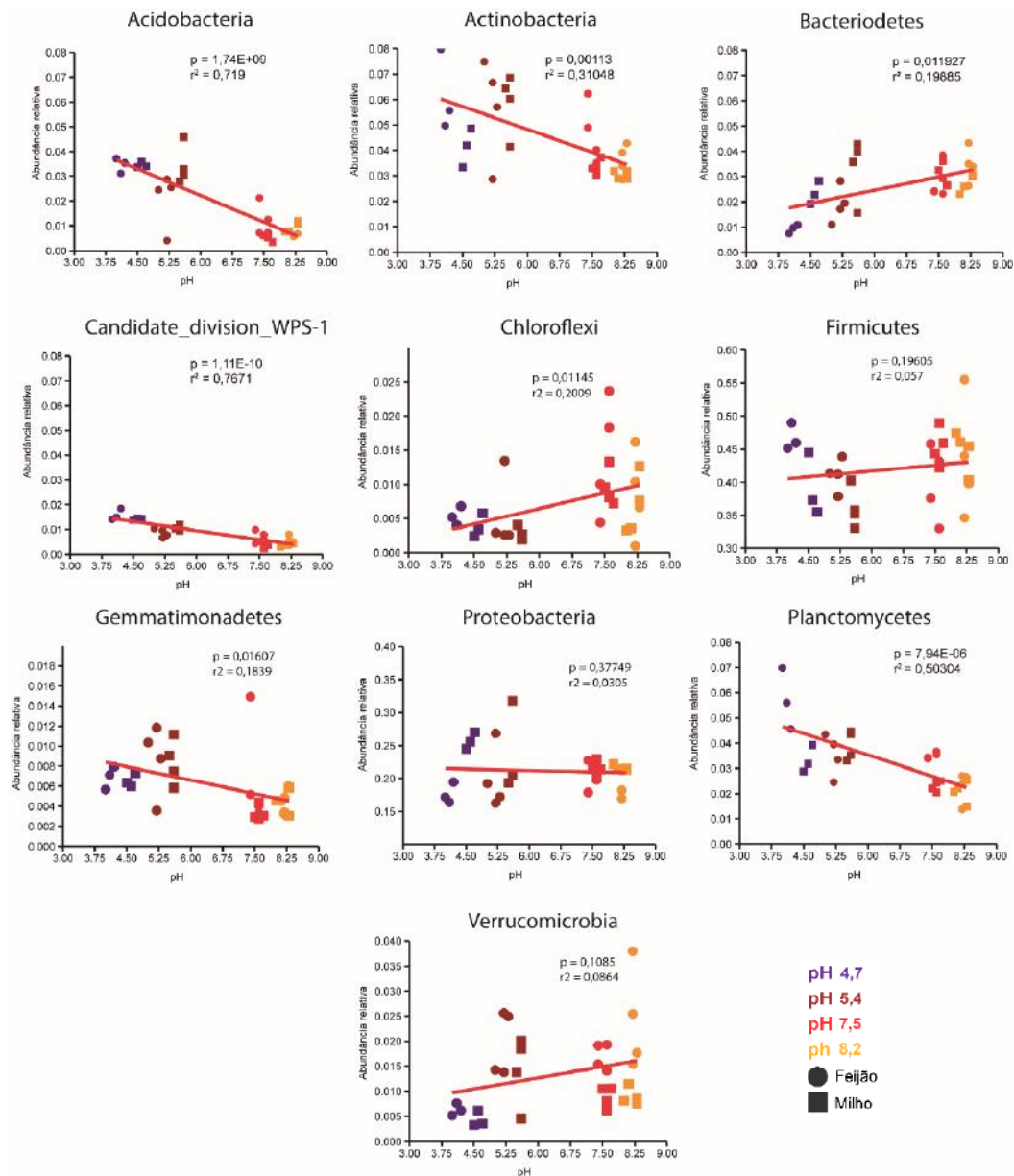
Segundo teste de Tukey, Actinobacteria, Acidobacteria, Candidate division WPS-1, Chloroflexi e Gemmatimonadetes foram influenciados pelo pH. O filo Proteobacteria foi mais influenciado pela cobertura vegetal e os filios Planctomycetes e Verrucomicrobia foram influenciados pelos dois fatores.



**Figura 8** – Abundância relativa dos principais filios bacterianos encontrados nos diferentes tratamentos, A. filios de maior abundância, B. filios de menor abundância. Em escala de verde tem-se a faixas de pH correspondentes ao tratamento com feijão e em escala de azul as faixas de pH correspondentes ao tratamento com milho. As letras nos gráficos indicam a influência significativa ( $p < 0,05$ ) do pH e os asteriscos (\*) a influência significativa do tipo de planta, segundo o teste de Tukey.

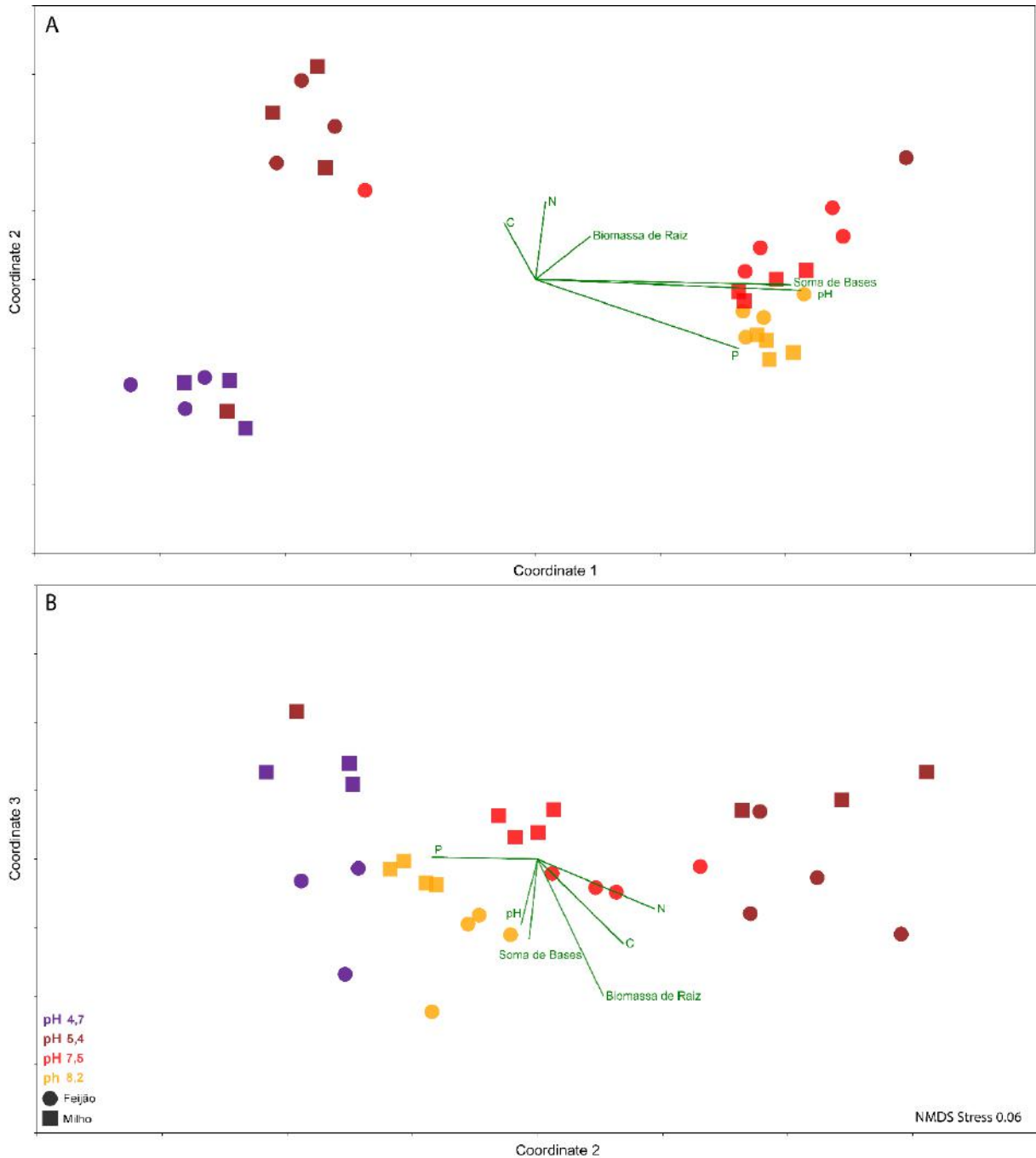
Para entender melhor como os filios eram influenciados pelos pH, utilizou-se modelagens matemáticas que demonstravam o comportamento destes filios frente a esse fator. Tais modelagens realizadas no programa Past3, consideravam o Índice de Akaike (Aicc) onde os menores valores indicavam melhor modelagem (Burnham e Anderson, 2002). Os filios

Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia não se correlacionam com as alterações no pH de maneira significativa ( $p < 0,05$ ), todos os demais filós foram modulados linearmente pelo pH. Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes e Candidate division WPS-1 apresentaram uma correlação negativa com o pH, enquanto Bacteroidetes e Chloroflexi apresentaram correlação positiva (Figura 9).



**Figura 9** – Influência do pH sobre a abundância relativa dos filós bacterianos mais abundantes neste estudo, baseada em modelagem matemática tendo o índice de Akaike (AICC) como referência.

Observando a estruturação da comunidade bacteriana, obtida através de uma ordenação multidimensional não métrica utilizando a distância de Bray-Curtis, é possível inferir que as comunidades bacterianas se encontram agrupadas de acordo com a faixa de pH em que se enquadram. Ou seja, as comunidades se diferenciam quanto ao valor de pH, ao observar o primeiro e o segundo eixo da ordenação (Figura 10A)



**Figura 10** – Ordenação multidimensional não métrica em 3 dimensões, baseada na matriz de distribuição das OTUs. Vetores verdes representam a correlação dos fatores abióticos com a comunidade microbiana, o grau de correlação representado pelo tamanho e a direção dos vetores. A. eixos 1 e 2 da ordenação, B. eixos 2 e 3.



Além disso, é possível observar a ação de outros fatores se correlacionando com as alterações nestas comunidades, como o fósforo assimilável e a soma das bases presentes no solo. Ao avaliar a mesma ordenação sob o foco dos eixos 2 e 3, verifica-se uma tendência de agrupamento das amostras de feijão na parte superior do eixo 3, e das amostras de milho na parte inferior do mesmo eixo (Figura 10B).

Para avaliar se as diferenças na estrutura da comunidade apresentadas por meio da NMDS eram significativas, utilizou-se um procedimento de permutação de respostas múltiplas (MRPP do inglês *Multi Response Permutation Procedure*). Este teste tem como objetivo avaliar de forma multivariada as diferenças entre os tratamentos, e pode ser utilizado em um modelo fatorial. Através da MRPP, observou-se que ambos os fatores exercem influência significativa sobre a comunidade bacteriana, contudo, a força dessa influência não é a mesma. Avaliando a média das somas dos quadrados, é possível observar que o fator "planta" apresenta valor de 0,23 enquanto o fator pH apresenta valor 6,22. A interpretação deste dado é que o pH influencia 2,7 vezes mais a comunidade microbiana que o tipo de planta.

**Tabela 3** – MRPP dos moduladores utilizados no trabalho e as OTUs

Grupos	Df	Soma dos quadrados	Médias dos quadrados da variância	R2	P valor
Planta	1	0,227	0,2269	0,0462	0,03720
pH	3	1867	0,6222	0,3798	0,00010
Planta + pH	3	0,450	0,1500	0,0916	0,09379
Resíduos	22	2371	0,1078	0,4825	
Total	29	4915		1	

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de estabelecer com sucesso um sistema controlado com variações crescentes de pH e cultivados com duas plantas de metabolismo distintos, se mostrando um bom modelo para estudos dos efeitos dos fatores tipo de planta e pH sobre a comunidade microbiana .

Em relação à resposta da comunidade microbiana sob o ponto de vista da  $\alpha$ -diversidade foi possível ver que o pH é capaz de promover alterações significativas. Esse processo foi descrito em sistemas já estabelecidos por Fierer e Jackson (2010), Chu e colaboradores (2010) e Thompson e colaboradores (2017). Contudo, até onde foi possível verificar, pela primeira vez foi descrito que a resposta ao pH é planta-dependente. Estudos de Burns e colaboradores (2015), que analisaram a rizosfera de angiospermas em uma floresta já estabelecida, demonstraram que a química do solo e a cobertura vegetal não agem de maneira independente sobre a estruturação da comunidade microbiana, o que corrobora os achados do presente estudo.

As características do ambiente rizosférico, individuais para cada tipo de planta, podem estar relacionadas a este resultado. Segundo Kowalchuck e colaboradores (2002), os exudatos radiculares possuem alta influência sobre a comunidade microbiana, e seria possível que a interação destas substâncias em conjunto com o pH modelem a diversidade neste ambiente.

Entretanto, Lauber e colaboradores (2013) demonstraram que a  $\alpha$ -diversidade sofre alta variação temporal, sugerindo cautela à interpretação destes dados. Segundo este autor, a  $\beta$ -diversidade é mais estável para avaliação dos impactos de fatores, como o uso de solo sobre a comunidade bacteriana.

Observando a abundância de filos, dentre os mais abundantes aparecem Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. Esta abundância não é comum em solos, estudos de Delgado-Baquerizo e colaboradores (2017) buscaram um padrão global de abundância bacteriana nos solos, e encontrou que Proteobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes e Chloroflexi estão entre os mais abundantes. Já Crowther e colaboradores (2014) demonstraram que Acidobacteria, Verrucomicrobia, Bacteriodetes e Proteobacterias estão entre os mais abundantes ao analisar amostras de solo da América do Norte.

Vale destacar que por mais que possam divergir quanto a colocação no ranking de mais abundantes, os principais integrantes não variam de uma lista para outra, porém variam a sua colocação no ranking. Contudo o filo mais abundante observado nas análises deste trabalho foi Firmicutes, o que segundo a literatura seria incomum.

Firmicutes é um filo presente em solos com poucos nutrientes, como em solos arenosos, tal como o do presente estudo. Tal filo também é encontrado em solos da Antártica (Teixeira et al, 2010), e conforme aumenta-se a profundidade do solo (Pereira et al, 2017).

Ao analisar a microbiota da rizosfera de plantas de milho, Garcia-Salamanca e colaboradores (2012) observaram Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Candidate division TM7, Betaproteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, como principais filios bacterianos. Neste experimento foi utilizado um solo semelhante ao solo utilizado em nosso trabalho, mas com pH 8,5. Por diferir do padrão de outras comunidades microbianas associadas ao milho, pode-se inferir que a comunidade que colonizou a rizosfera das plantas utilizadas no experimento de 2012, estava presente no solo.

Foram testados vários modelos matemáticos para observar a resposta da abundância relativa de cada filo em função da variação do pH. Conforme demonstraram os testes de modelagens matemáticas, alguns filios bacterianos sofrem influência do pH, enquanto outros não. Porém, entre os que apresentam influência significativa, a resposta sempre segue um padrão linear. Nenhum modelo polinomial apresentou melhor ajuste que os modelos lineares.

A resposta ao pH é grupo específico, ou seja, cada filo bacteriano responde de uma forma. Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia foram os únicos filios testados que não foram influenciados pelo pH. Os filios Acidobacteria, Actinobacteria, Candidato a divisão WPS-1, Gemmatimonadetes e Planctomycetes apresentam redução da abundância relativa com o aumento do pH, já Bacteroidetes, Chloroflexi apresentam aumento da abundância.

Em relação à estrutura da comunidade como um todo, avaliada pela  $\beta$ -diversidade, houve influência de ambos os fatores testados, o pH e da cobertura vegetal. O pH apresentou o papel de principal modulador. Esse fenômeno já era esperado, e foi descrito por Chu e colaboradores (2010), que compararam amostras do solo ártico com outras ao redor do mundo, e verificaram que a estrutura da comunidade era basicamente modulada pelo pH. Assim como aconteceu para a  $\alpha$ -diversidade, o pH atuou de maneira significativa, o que foi demonstrado por Fierer e Jackson (2006) em escala global utilizando amostras de diversos biomas.

Em uma revisão de Fierer (2017) em que apresenta os fatores que determinam a complexidade do microbioma do solo, os autores falam justamente de diversos fatores, entre os quais, o pH e a cobertura vegetal. O pH é classificado como principal fator que atua sobre a comunidade microbiana, seguido de outros fatores como: disponibilidade de nitrogênio, quantidade de carbono orgânico, temperatura, entre outros. Para esse autor a cobertura vegetal é um dos fatores que menos teria a capacidade de influenciar a comunidade bacteriana do solo.

Contudo, o presente trabalho mostra que o tipo de planta é também importante na estruturação da comunidade.

O trabalho de Prober e colaboradores (2015) mostraram que a  $\alpha$ -diversidade de plantas não atuava sobre a  $\alpha$ -diversidade microbiana, porém, com relação a  $\beta$ -diversidade havia sim influência significativa. Esse mesmo padrão foi observado no presente trabalho. Um dos fenômenos que pode levar as plantas a influenciar um determinado grupo de bactérias é o processo de seleção ativa da microbiota rizosférica, através de exsudatos radiculares. Isso vai ao encontro com a afirmação de que as espécies de plantas selecionam especificamente a sua comunidade bacteriana, como foi descrito por Ciccazzo e colaboradores (2014).

Um dos principais objetivos deste trabalho era quantificar o quanto cada um dos fatores testados era capaz de modificar a comunidade bacteriana do solo. Esse tipo de avaliação pode ser realizada a partir da comparação das média das somas dos quadrados (MSQ) da MRPP, que é uma análise multivariada que compara as distâncias matemáticas entre amostras, levando em conta todos os elementos que a compõe. As somas dos quadrados representam toda a variabilidade contida em cada amostra, e decompõe essa variabilidade em função dos fatores testados. O fato do fator "planta" apresentar valor de MSQ de 0,23 enquanto o fator pH apresenta valor de 6,22 indica que o pH pode influenciar a comunidade bacteriana aproximadamente 3 vezes mais que o tipo de planta presente no solo.

Estes dados deste trabalho confirmam dados como os de Fierer (2017), que demonstram a superioridade do pH como modulador de comunidades microbianas. Contudo tais dados obtidos neste trabalho, vão de encontro a estudos de Lamb, Kennedy e Siciliano (2011) em que as plantas podem influenciar a riqueza e a estruturação das comunidades bacterianas.

A grande influência do pH sobre a comunidade bacteriana pode ser explicada em diversos estudos que observaram a fisiologia bacteriana em condições de estresse gerado por alterações no pH do meio, como o de Baatout et al. (2007). Neste trabalho os pesquisadores demonstraram a influência do pH sobre estruturas da célula bacteriana importantes para sua fisiologia. Alterações em pH resultaram em alterações em estruturas de membrana das bactérias, impactando em seu metabolismo. Outra forma de atuação do pH é sobre a biodisponibilidade de nutrientes. A atuação deste fator pode se dar através da concentração de nutrientes, o que resulta em um aumento na biodisponibilidade de alguns nutrientes, como P, Fe e Zn (Comerford, 2005). Ou seja, o pH pode agir de forma direta ou indireta, se tornando crucial para o estabelecimento de comunidades microbianas.

Contudo observa-se também a influência das plantas sobre as comunidades bacterianas. Através dos exudatos radiculares as plantas podem atrair para a rizosfera diferentes micro-organismos (Sasse, Martinoia e Northen, 2018). Porém a sua composição pode variar conforme o genótipo (Mönchgesang et al., 2016), o estágio de desenvolvimento (Chaparro, Badri e Vivanco, 2014) e estresses abióticos (Carvalhais et al., 2013). Sendo assim diferentes plantas podem diferenciar entre si suas comunidades microbianas.

O presente estudo demonstrou, em condições controladas, que a composição da comunidade microbiana é fruto da combinação dos fatores pH e tipo de planta, com maior influência do primeiro. A comunidade microbiana de um solo ácido não é capaz de acidificar novamente o solo após a adição de substâncias químicas que o tornam básico. Ao contrário, ela se modifica e se adapta a esta nova condição. A forma como isso ocorre depende do tipo de planta que coloniza o ambiente, e cada grupo bacteriano responde de uma forma a esse processo de recolonização do ambiente frente à uma nova pressão seletiva.

Graças aos avanços nas tecnologias de sequenciamento genético, a microbiologia ambiental está passando por um processo intenso de redescoberta. Estudos de ecologia microbiana demonstram a enorme importância das comunidades de micro-organismos na manutenção da estabilidade dos ecossistemas e tentam se apropriar biotecnologicamente desse conhecimento. A microbiologia de solos é provavelmente a última fronteira a ser controlada, dado o seu grau de heterogeneidade química, física e principalmente biológica. Nesse contexto, estudos como este aprofundam o entendimento de como os diferentes membros das comunidades bacterianas do solo respondem a determinados estímulos, e aproximam de um momento no qual talvez seja possível manipular as comunidades de forma a trazer o maior benefício produtivo de cada ecossistema.

## 7. CONCLUSÃO

Tanto o pH quanto o tipo de planta apresentam influência sobre a estrutura da comunidade bacteriana. No modelo testado, as variações do pH apresentaram uma influência aproximadamente 3 vezes maior que as plantas.

A resposta aos fatores é grupo específico, ou seja, cada filo bacteriano responde de uma forma. Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia foram os únicos filotaxões testados que não foram influenciados pelo pH, mas os dois últimos foram influenciados pelo tipo de planta.

Os filotaxões Acidobacteria, Actinobacteria, Candidato a divisão WPS-1, Gemmatimonadetes e Planctomycetes apresentam redução da abundância relativa conforme ocorre o aumento do pH, já Bacteroidetes, Chloroflexi apresentam aumento.

Acidobacteria, Candidato a divisão WPS-1 e Planctomycetes são os filotaxões que exibem resposta mais forte em relação ao pH.

Trabalhos como este são importantes para elevar o grau de entendimento sobre a ecologia microbiana, auxiliando no desenvolvimento de estratégias que possam levar à manipulação do microbioma do solo.

## 8. REFERÊNCIAS

- \_\_\_\_\_. (1997). Manual de Métodos de Análise de Solo. EMBRAPA, Claessen, M. E. C., Barreto, W. D. O., Paula, J. L. De, & Duarte, M. N. eds. (Brasília, EMBRAPA).
- \_\_\_\_\_. (2002). Advances issues and deeper insights. In: Model selection and multimodel interference: A practical information-theoretic approach. Burnham, K. P., e Anderson, D. R. (Nova Iorque, Elsevier). 267-346.
- \_\_\_\_\_. (2013). Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. Freire, L. R., Balieiro, F. de C., Zonta, E., Anjos, L. H. C. dos, Pereira, M. G., Lima, E., ... Campos, D. V. B. de. eds.(Brasília, DF: Embrapa).
- \_\_\_\_\_. (2016). Brock biology of microorganisms. M. T. Madigan, J. M. Martinko, P. V. Dunlap, & D. P. Clark, Eds. (Boston, Pearson) 15th ed, 682-684.
- Allen, A., e Schlesinger, W. . (2004). Nutrient limitations to soil microbial biomass and activity in loblolly pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 581–589.
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A., e Mergeay, M. (2007). Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronautica*, 60, 451–459.
- Bach, E. M., Williams, R. J., Hargreaves, S. K., Yang, F., e Hofmockel, K. S. (2018). Greatest soil microbial diversity found in micro-habitats. *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 217–226.
- Berg, G., e Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. 68,1-13.
- Burns, J. H., Anacker, B. L., Strauss, S. Y., & Burke, D. J. (2015). Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. *AoB PLANTS*, 7, 1–10.
- Cardoso, E. J., Tsai, S. M. e Neves, M. C. P. (1992). Microbiologia do solo. (Campinas, Sociedade Brasileira de Microbiologia). 360p
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., von Wiren, N. e Borriss, R. (2013). Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. *PLoS ONE*, 8.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., e Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8, 790–803.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., e Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 489–499.
- Cho, S.-J., Kim, M.-H., e Lee, Y.-O. (2016). Effect of pH on soil bacterial diversity. *Journal of Ecology and Environment*, 40, 10.
- Chotte, J. (2015). Importance of Microorganisms for Soil Aggregation. In *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Buscot, F. e Varma, A. eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag). 107–119.
- Chu, H., Fierer, N., Lauber, C. L., Caporaso, J. G., Knight, R., e Grogan, P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 12, 2998–3006.
- Ciccazzo, S., Esposito, A., Rolli, E., Zerbe, S., Daffonchio, D., e Brusetti, L. (2014). Different pioneer plant species select specific rhizosphere bacterial communities in a high mountain environment. *SpringerPlus*, 3, 1–10.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., e Tiedje, J. M. (2008). *Nucleic Acids Research*, 37, D141-D145.
- Coleman, D. C., e Crossley, D. A. (1996). *Fundamentals of soil ecology*. Academic Press.
- Comerford N. (2005) Soil Factors Affecting Nutrient Bioavailability. In: *Nutrient Acquisition by Plants. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. BassiriRad H. eds. (Berlin, Heidelberg, Springer)
- CONAB (2017) Ministério da Agricultura, Pesca e Agripecuária. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>item>download> . Acesso em: 27/08/2019.
- Costa, A. C. S., Nanni, M. R., e Jeske, E. (1997). Determinação da umidade na capacidade de campo e ponto de murcha permanente por diferentes metodologias. *Revista UNIMAR*, 19, 827–844.

- Cotta, S. R. (2016). O solo como ambiente para a vida microbiana. In: *Microbiologia do solo*. Cardoso, E. J. B. N. e Andreote F. D., eds. (Piracicaba, ESALQ) 23-35.
- Crowther, T. W., Maynard, D. S., Leff, J. W., Oldfield, E. E., Mcculley, R. L., Fierer, N., e Bradford, M. A. (2014). Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: A cross-biome study. *Global Change Biology*, 20, 2983–2994.
- Cuer, C. A., Rodrigues, R. de A. R., Balieiro, F. C., Jesus, J., Silva, E. P., Alves, B. J. R., e Rachid, C. T. C. C. (2018). Short-term effect of Eucalyptus plantations on soil microbial communities and soil-atmosphere methane and nitrous oxide exchange. *Scientific Reports*, 8, 15133.
- De León-Lorenzana, A. S., Delgado-Balbuena, L., Domínguez-Mendoza, C. A., Navarro-Noya, Y. E., Luna-Guido, M., e Dendooven, L. (2018). Soil Salinity Controls Relative Abundance of Specific Bacterial Groups Involved in the Decomposition of Maize Plant Residues. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 51.
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-gonzález, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., Singh, B. K. e Fierer, N. (2018). Bacteria Found in Soil. *Science*, 325, 320–325.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovestsky, O. A., Mieszkina, S., Millet, L.J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, P. B., Olsson, S., van Elsas, J. D. e Wick, L. Y. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42, 335–352.
- Dexter, A. R. (1988). Advances in characterization of soil structure. In: *Soil and Tillage Research*, 11, 199–238.
- Ding, J., Zhang, Y., Wang, M., Sun, X., Cong, J., Deng, Y., Lu, H., Yuan, T., van Nostrand, J.D., Li, D., Zhou, J. e Yang, Y. (2015). Soil organic matter quantity and quality shape microbial community compositions of subtropical broadleaved forests. *Molecular Ecology*, 24, 5175–5185.
- Döbereiner, J. (1966). Evaluation of Nitrogen Fixation in Legumes by the Regression of Total Plant Nitrogen with Nodule Weight. *Nature*, 210, 850–852.
- Eisenhauer, N., Bessler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., Partsch, S., Sabais, A. C.W., Scherber, C., Steinbeiss, S., Weiglet, A., Weisser, W. W. e Scheu, S. (2010). Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, 91, 485–496.
- Emerson, W. W. (1959). The structure of soil crumbs, 10(2). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2389.1959.tb02346.x>> . Acesso em: 27. dez. 2019.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 579–590.
- Fierer, N., e Jackson, R. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 103, 626–631.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., e Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4117–4120.
- Fonseca, E. da S., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Balieiro, F. de C., Tiedje, J. M., e Rachid, C. T. C. da C. (2018). The Microbiome of Eucalyptus Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. *Microbial Ecology*, 75, 183–191.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M. A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E. e Ramos, J. L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6, 36–44.
- Gul, S., e Whalen, J. K. (2016). Biochemical cycling of nitrogen and phosphorus in biochar-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 1–15.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. a. T., e Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1–9.
- Harris, R. F., Allen, O. N., Chesters, G., e Aitoe, O. J. (1963). Evaluation of Microbial Activity in Soil Aggregate Stabilization and Degradation by the Use of Artificial Aggregates 1, 542–545.
- Hayatsu, M., Tago, K., e Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 33–45.



- Jin, Q., e Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. Thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 21.
- Jones, R. T., Robeson, M. S., Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., e Fierer, N. (2009). A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*, 3, 442–453.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., De Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., e Van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, 509–520.
- Lamb, E. G., Kennedy, N., e Siciliano, S. D. (2011). Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant and Soil*, 338, 483–495.
- Lang, F., Bauhus, J., Frossard, E., George, E., Kaiser, K., Kaupenjohann, M., Krüger, J., Matzner, E., Polle, A., Priezel, J., Rennenberg e Wellbrock, N. (2016). Phosphorus in forest ecosystems: New insights from an ecosystem nutrition perspective. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179, 129–135.
- Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Aanderud, Z., Lennon, J., e Fierer, N. (2013). Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME Journal*, 7(8), 1641–1650.
- Leff, J. W., Bardgett, R. D., Wilkinson, A., Jackson, B. G., Pritchard, W. J., De Long, J. R., Oakley, S., Manson, K. E., Ostle, N. J., Johnson, D., Baggs, E. M. e Fierer, N. (2018). Predicting the structure of soil communities from plant community taxonomy, phylogeny, and traits. *The ISME Journal*, 12(7), 1794–1805.
- Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firm, J. L., Harple, W. S., Hobbie, S. E., Hofmockel, K. S., Knops, J. M. H., McCulley, R. L., La Pierre, K., Risch A. C., Seabloom, E. W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C. J. e Fierer, N. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 10967–10972.
- Laghari, S. J., Wahocho, N. A.,Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HssainTalpur, K., HussainTalpur, K., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A. e Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Advances in Enviromental Biology*, 10(9). 209-218.
- Liu, S., Ren, H., Shen, L., Lou, L., Tian, G., Zheng, P., e Hu, B. (2015). pH levels drive bacterial community structure in the Qiantang River as determined by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–7.
- Lozupone, C. A., e Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11436–11440.
- Mitchell, R. J., Hester, A. J., Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Hewison, R. L., e Potts, J. M. (2010). Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community? *Plant and Soil*, 333, 417–430.
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Muller, E., Herklotz, S., Neumann, S. e Scheel, D. (2016). Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Lan Di, L., Pietramellar, G., e Renell, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655.
- Oliverio, A. M., Bradford, M. A., e Fierer, N. (2017). Identifying the microbial taxa that consistently respond to soil warming across time and space. *Global Change Biology*, 23, 2117–2129.
- Pereira, A. P. A., Andrade, P. A. M., Bini, D., Durrer, A., Robin, A., Bouillet, J.P., Andreote, F.D. e Cardoso, E. J. B. N.(2017) Shifts in the bacterial community composition long deep soil profiles in monospecific and mixed stands of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. *PLoS ONE*, 12, 1-15..
- Prober, S. M., Leff, J. W., Bates, S. T., Borer, E. T., Firm, J., Harpole, W. S., Lind, E. M., Seabloom, E. W., Adler, P. B., Bakker, J. D., Cleland, E. E., DeCrappeo, N. M., DeLorenze, E., Hagenah, N., Hautier, Y., Hofmockel, K.S., Kirkman, K. p., Knops, J. M. H., La Pierre, K. J., MacDougall, A. S., McCulley, Mitchell, C. E., Risch, A. C., Schuetz, M., Stevens, C. J., Willians, R. J. e Fierer, N. (2015). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters*, 18, 85–95.
- Proença, D. N., Schwab, S., Baldani, J. I., e Morais, P. V. (2017). Diversity and Function of Endophytic Microbial Community of Plants with Economical Potential. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* . Azevedo, J. L. e Quecine, M. C. eds. (Piracicaba, Springer International Publishing) pp. 209–243.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. e Glöckner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D595.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (Viena, Austria). Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.
- Rachid, C. T. C. C., Balieiro, F. C., Peixoto, R. S., Pinheiro, Y. A. S., Piccolo, M. C., Chaer, G. M., e Rosado, A. S. (2013). Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. *Soil Biology and Biochemistry*, 66, 146–153.
- Rachid, C. T. C. da Costa. (2010). Comunidade bacteriana, atributos do solo e fluxo de gases em solo sob Cerrado e cana-de-açúcar - Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 123f.
- Rachid, Caio T C C, Balieiro, F. C., Fonseca, E. S., Peixoto, R. S., Chaer, G. M., Tiedje, J. M., e Rosado, A. S. (2015). Intercropped silviculture systems, a key to achieving soil fungal community management in eucalyptus plantations. *PLoS ONE*, 10(2), 1–13.
- Rachid, Caio T. C. C., Santos, A. L., Piccolo, M. C., Balieiro, F. C., Coutinho, H. L. C., Peixoto, R. S., Tiedje, J. M. e Rosado, A. S. (2013). Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE*, 8(3), e59342.
- Raghothama, K. G. (1999). PHOSPHATE ACQUISITION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 665–693.
- Santos, H. G. dos, Jacomine, P. K. T., Anjos, L. H. C. dos, Oliveira, V. Á. de, Oliveira, J. B. de, Coelho, M. R., Cunha, T. J. F. (2006). Sistema brasileiro de classificação de solos. (Rio de Janeiro, Embrapa Solos).
- Sasse, J., Martinoia, E., e Northen, T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, 23, 25–41.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. e Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537–7541.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., e Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: Opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*, 12, 386–393.
- Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C., e Straight, P. D. (2016). Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Frontiers in Microbiology*, 12. 386-393.
- Teixeira, L. C. R. S., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje, J., e Rosado, A. S. (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *ISME Journal*, 4, 989–1001.
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., ... Zhao, H. e Knight, R. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551, 457.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., e Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 782–787.
- Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., e Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296–310.
- Wang, B., Brewer, P. E., Shugart, H. H., Lerdau, M. T., e Allison, S. D. (2018). Soil aggregates as biogeochemical reactors and implications for soil-atmosphere exchange of greenhouse gases-a concept. *Global Change Biology*, 1, 1–13.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., e Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6578–6583.

### 9. Anexo I – Cálculos para curva Dose X Resposta

Sabendo que 1 hectare equivale a  $10000m^2$

Considerando que utilizaríamos a porção de 20cm do solo, temos:

$$10000m^2 \times 0,2m = 2000m^3$$

Sendo assim o volume de solo em 20cm de 1ha é de  $2000m^3$ .

Sabendo que a densidade do solo é de  $1,37g/cm^3$  e o volume do hectare, temos

$$D = \frac{m}{v}$$

$$m = D \cdot v$$

$$m = 1,37 \times 2000$$

$$m = 2740t$$

Temos então que a massa de solo em toneladas em 1 ha é de 2740t.

Com estes dados podemos então calcular a quantidade de  $CaCO_3$  que será utilizada em cada faixa com os seguintes cálculos:

- Faixa 2:

$$500kg \text{ de } CaCO_3 \equiv 2740000 \text{ kg de solo}$$

$$x \equiv 0,2 \text{ kg de solo}$$

$$x = 0,00000364964 \text{ kg} = 0,0365g = 36,5 \text{ mg de } CaCO_3$$

- Faixa 3:

$$1500kg \text{ de } CaCO_3 \equiv 2740000 \text{ kg de solo}$$

$$x \equiv 0,2 \text{ kg de solo}$$

$$x = 0,0000949 \text{ kg} = 0,1094g = 109,4 \text{ mg de } CaCO_3$$

- Faixa 4:

$$6000kg \text{ de } CaCO_3 \equiv 2740000kg \text{ de solo}$$

$$x \equiv 0,2kg \text{ de solo}$$

$$x = 0,00043796kg = 0,4379g = 437,9mg \text{ de solo}$$

- Faixa 5:

$$9000kg \text{ de } CaCO_3 \equiv 2740000kg \text{ de solo}$$

$$x \equiv 0,2kg \text{ de solo}$$

$$x = 0,00065693kg = 065693g = 656,9kg \text{ de solo}$$

O volume de solo em cada recipiente se da por :

$$D = \frac{m}{v}$$

$$v = \frac{m}{D}$$

$$v = \frac{200}{1,37}$$

$$v = 145,9 \text{ cm}^3$$

Logo, o volume de solo em cada recipiente é de 145,9cm<sup>3</sup>.

## 10. Anexo II - Cálculos de macronutrientes e micronutrientes

Para ajustar a quantidade de fósforo e potássio foi utilizado o método descrito no manual de adubação da EMBRAPA. O ajuste de nitrogênio foi realizado conforme o documento da EMBRAPA número 72/ISN1672

Cálculos:

- Quantidade de Potássio para se corrigir a quantidade do elemento no solo:

$$94,2g \text{ de } K_2O \equiv 78g \text{ de } K$$

$$40Kg \text{ de } K_2O \equiv x$$

$$x = 33,12Kg \text{ de } K$$

- Quantidade de Fósforo para se corrigir a quantidade do elemento no solo:

$$142g \text{ de } P_2O_5 \equiv 78g \text{ de } P$$

$$40Kg \text{ de } P_2O_5 \equiv x$$

$$y = 39,3Kg \text{ de } P$$

- Para adicionar fósforo no sistema foi utilizado Fosfato de potássio monobásico. Sendo assim foram adicionados estequiometricamente a seguinte quantidade:

$$136,09g \text{ de } KH_2PO_4 \equiv 39,1g \text{ de } K$$

$$x \equiv 33,12Kg \text{ de } K$$

$$y = 115,3Kg \text{ de } KH_2PO_4 \text{ por ha}$$

- Como o elemento escolhido já possuía em sua composição fósforo, foi necessário saber a quantidade de fósforo já adicionada e a quantidade que seria necessária adicionar para se alcançar a quantidade ideal.

$$136,09g \text{ de } KH_2PO_4 \equiv 39,1g \text{ de } K$$

$$115,30g \text{ de } KH_2PO_4 \equiv x$$

$$x = 26,30Kg \text{ de } P$$

Logo é necessário adicionar no solo:

$$39,3Kg - 26,3Kg = 13Kg \text{ de } P$$

Para isso, a diferença será completada com fosfato de sódio:

$$119,8g \text{ de } NaH_2PO_4 \equiv 39,1g \text{ de } P$$

$$x \equiv 13Kg \text{ de } P$$

$$x = 51,8Kg \text{ de } NaH_2PO_4 \text{ por ha}$$

- A quantidade de nitrogênio foi corrigida com a adição de Uréia. A correção estequiométrica foi feita da seguinte maneira:

$$60,06g \text{ de } (NH_2)_2CO \equiv 28g \text{ de } N$$

$$x \equiv 100Kg \text{ de } N$$

$$x = 214,5Kg \text{ de } (NH_2)_2CO \text{ por ha}$$

- A quantidade de magnésio adicionada segue a seguinte proporção de 3Ca:Mg, em Kg/ha:

	Ca	Mg
Faixa 1	0	0
Faixa 2	0.6	0.2
Faixa 3	3.4	1.13
Faixa 4	10.9	3.63

A quantidade de magnésio foi corrigida com a MgO das seguintes formas:

Faixa 2 :  $200Kg \text{ de } MgO \equiv 2740000Kg \text{ de solo}$

$$x \equiv 4Kg \text{ de solo}$$

$$x = 0,04g \text{ de } MgO$$

Faixa 3 :  $1130Kg \text{ de } MgO \equiv 2740000Kg \text{ de solo}$

$$x \equiv 4Kg \text{ de solo}$$

$$x = 0,22g \text{ de } MgO$$

Faixa 4 :  $200Kg \text{ de } MgO \equiv 2740000Kg \text{ de solo}$

$$x \equiv 4\text{Kg de solo}$$

$$x = 0,04\text{g de MgO}$$

- Para corrigir os valores de Kg/ha para 4Kg foi utilizado um fator de correção, que considerava a profundidade de 0-20cm:

$$1\text{ha} \equiv 2740000\text{Kg de solo}$$

$$1\text{ vaso} \equiv 4\text{Kg de solo}$$

$$\text{Fator de correção} = \frac{4 \times 1000}{2740000} = 0,00146$$

- A quantidade de micronutrientes foi adicionada segundo a proporção de 0,1g por Kg de solo, logo cada vaso recebeu 0,4g de micronutrientes.

- Seguindo estes cálculos, as quantidades de nutrientes ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de solo adicionadas em cada faixa:

	Faixa 1	Faixa 2	Faixa 3	Faixa 4
Fosfato de Potássio	0.34	0.34	0.34	0.34
Fosfato de Sódio	0.16	0.16	0.16	0.16
Uréia	0.626	0.626	0.626	0.626
Óxido de Magnésio	-	0.25	1.375	4.625
Carbonato de Cálcio	-	0,217	1,2407	3,9778
Micronutrientes	0.8	0.8	0.8	0.8