

Quantificação da microbiota do solo sob diferentes sistemas integrados de produção na Amazônia meridional

Quantification of soil microbiota under different integrated production systems in meridional Amazon

Carolina Hortêncio Malheiros^I, Daniela Tiago da Silva Campos^{II}, Kuang Hongyu^{II},
Waldinei do Prado Lacerda^{II}, Luiz Antonio de Oliveira^{III}, Flávio Jesus Wruck^{IV}

^IRede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal. Manaus, Amazonas, Brasil

^{II}Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

^{III}Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, Brasil

^{IV}Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agrossilvipastoril. Sinop, Mato Grosso, Brasil

Resumo: O estudo objetivou quantificar os genes 16S rDNA de bactérias e arqueas e 18S rDNA de fungos e atributos químicos do solo, sob diferentes sistemas integrados, bem como solo sob rotação soja/pastagem e mata nativa, avaliando suas diferenças na Amazônia meridional. Sistemas compostos pelas espécies florestais eucalipto e paricá em linha simples, dupla e tripla, uma área de mata nativa e um sistema de rotação soja/pastagem foram avaliados, utilizando-se atributos químicos e moleculares, sendo os dados obtidos verificados pelo teste de Kruskal Wallis e análise discriminante canônica. Os teores de pH, P, H + Al, Mg e matéria orgânica apresentaram diferenças significativas, influenciando a microbiota do solo. A abundância da microbiota apresentou diferenças significativas entre os sistemas avaliados. As bactérias (10^9) mostraram-se mais abundantes do que arqueas (10^6) e fungos (10^6). A abundância dos microrganismos é regulada e moldada de acordo com os diferentes sistemas de manejo do solo, vegetação e arranjos em linhas dos sistemas integração lavoura-pecuária-floresta. Os fungos apresentaram maior variação entre os sistemas e a mata nativa, podendo servir de parâmetro de comparação de estabilidade e de condições ambientais. As bactérias não se mostraram apropriadas para a comparação de estabilidade e de condições ambientais dos sistemas estudados.

Palavras-chave: Integração lavoura-pecuária-floresta. PCR em tempo real. Gene 16S rDNA. Gene 18S rDNA.

Abstract: The objective of this study was to quantify the 16S rDNA genes of bacteria and archaea and the 18S rDNA genes of fungi, and the soil chemical attributes under different integrated systems of cultivation, as well as soil under rotation soybean/pasture and native forest, in order to evaluate their differences in the southern Amazon. Systems composed of single, double, and triple eucalyptus and paricá forest species, a native forest area, and a soybean/pasture rotation system were evaluated using chemical and molecular soil attributes, and the data were evaluated by the Kruskal Wallis test and canonical discriminant analysis. The pH, P, H + Al, Mg and organic matter contents presented significant differences, which influence the soil microbiota. The abundance of the microbiota showed significant differences among the evaluated systems. Bacteria (10^9) were more abundant than archaea (10^6) and fungi (10^6). The abundance of microorganisms are regulated and shaped according to the different soil management systems, vegetation, and line arrangements of the crop-livestock-forest integration systems. The fungi presented the greatest variation among the systems and the native forest, serving as a parameter of comparison of stability and environmental conditions. Bacteria did not prove adequate for the comparison of stability and environmental conditions of the studied systems.

Keywords: Crop-livestock-forest integration. Real-time PCR. 16S rDNA gene. 18S rDNA gene.

MALHEIROS, C. H., D. T. S. CAMPOS, K. HONGYU, W. P. LACERDA, L. A. OLIVEIRA & F. J. WRUCK, 2017. Quantificação da microbiota do solo sob diferentes sistemas integrados de produção na Amazônia meridional. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 12(3): 387-398.

Autora para correspondência: Carolina Hortêncio Malheiros. Universidade Federal de Mato Grosso. Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade. Laboratório de Microbiologia do Solo. Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367 – Boa Esperança. Cuiabá, MT, Brasil. CEP 78068-600 (chmalheiros@gmail.com).

Recebido em 27/06/2017

Aprovado em 21/11/2017

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



INTRODUÇÃO

Localizado em clima tropical, o bioma Cerrado mato-grossense faz transição com o bioma amazônico. Este ecótono, no estado de Mato Grosso, é marcado por uma redução drástica em sua área de cobertura vegetal original (Maracahipes *et al.*, 2011). O desmatamento nesta região de transição ocorreu de forma acelerada nos últimos anos, sendo a abertura de áreas para a criação de gado e o cultivo de soja apontados como as principais causas do desmatamento (Hunke *et al.*, 2015).

Com o aumento destas atividades antrópicas, o uso sustentável dos recursos naturais, especialmente do solo e da água, tem surgido como tema relevante, considerando que a manutenção da qualidade desses recursos também é essencial para o crescimento e o desenvolvimento de plantas e também para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Araújo *et al.*, 2010).

A adoção de sistemas agroflorestais, como a integração lavoura-pecuária-floresta (iLPF), formada por espécies de culturas diferentes e por componente animal, apresenta maiores benefícios ecológicos e econômicos ao ambiente (Wang & Cao, 2011). O componente forrageiro, em conjunto com as árvores e culturas agrícolas, reativa o processo funcional do solo, resultando em melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Vanlauwe *et al.*, 2010).

Plassart *et al.* (2008), ao avaliarem propriedades microbiológicas em sistema intensivo de lavoura, pastagem permanente, pastagem com rotação de culturas e pastagens recém-estabelecidas, observaram que os diferentes manejos do solo influenciaram na estrutura genética e na atividade da comunidade microbiana. A área sob pastagem permanente aumentou a comunidade de bactérias e de fungos, sendo as bactérias as mais afetadas. Os autores concluíram que o manejo do solo está associado a mudanças na comunidade microbiana, e que a restauração de pastagens promove impacto positivo na manutenção do estado funcional do solo.

Nos sistemas iLPF, a oferta de matéria orgânica do solo é contínua, devido à presença das árvores e das plantas forrageiras, além dos dejetos animais dispostos na área, que estimulam a diversidade da microbiota do

solo, reforçando a importância de seu conhecimento na avaliação da sustentabilidade ambiental (Loss *et al.*, 2014).

Avanços no campo da ecologia molecular microbiana têm permitido o acesso a informações sobre o grande número de microrganismos e sua diversidade funcional. Essas técnicas baseiam-se na reação da polimerase em cadeia (PCR) e na posterior análise de fragmentos específicos do DNA ou do RNA das amostras de interesse (Mendes *et al.*, 2014).

Os genes ribossomais 16S rDNA e 18S rDNA representam marcadores ecológicos conservados para procariontos e eucariontos, respectivamente. Com base neles, é possível descrever componentes estruturais da microbiota do solo, pois são capazes de fornecer informações sobre sequências do DNA ou do RNA extraído e amplificado a partir de amostras-alvo (Laiz *et al.*, 2011).

Atualmente, há grande quantidade de ferramentas moleculares que visam acessar a comunidade microbiana do solo, como a PCR em tempo real (qPCR), técnica muito sensível e usada para a quantificação do gene-alvo em amostras de solo, permitindo uma avaliação rápida da abundância de grupos filogenéticos específicos de microrganismos (Fierer *et al.*, 2005). Embora essa técnica não permita acessar a diversidade presente no ambiente, a qPCR é usada para avaliar alterações ocorridas em grupos específicos sob diferentes condições ambientais (Morales *et al.*, 2010).

Fierer *et al.* (2005) utilizaram a qPCR a fim de avaliar a estrutura da comunidade microbiana do solo em níveis taxonômicos gerais e de quantificar a abundância dos grupos predominantes de bactérias e de fungos encontrados no solo. Usando uma abordagem similar, Rousk *et al.* (2010) usaram a qPCR para determinar a abundância relativa de bactérias e de fungos em solos com variação de pH.

Considerando a relevância da quantificação da comunidade microbiana na avaliação de sistemas de manejo do solo, o presente estudo objetivou quantificar o número de cópias dos genes 16S rDNA de bactérias e arqueas e 18S rDNA de fungos, bem como os atributos químicos do solo sob diferentes sistemas de integração

lavoura-pecuária-floresta e do solo sob rotação soja/pastagem e mata nativa, buscando avaliar as diferenças entre os sistemas iLPF e sua sustentabilidade na Amazônia meridional.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DO SOLO

A área de estudo está localizada na Amazônia meridional, no município de Nova Canaã do Norte, estado do Mato Grosso (Figura 1), na fazenda Nova Gamada (S 10° 33' 29"; W 55° 57' 11"). A área é caracterizada como transição entre Cerrado e floresta amazônica, que possui uma unidade de referência tecnológica (URT) da Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O solo da região é do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd) e o relevo é suave ondulado (EMBRAPA, 2013). O clima, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Aw, com precipitação média anual de 1.505,1 mm e temperatura média do ar de aproximadamente 23 °C (Agrimtempo, 2016).

No ano agrícola de 2008/2009, nos meses de dezembro e janeiro, foi estabelecida, nessa fazenda, uma URT da EMBRAPA Agrossilvipastoril. Essa área foi dividida com diferentes arranjos de sistemas iLPF e com diferentes espécies florestais. No momento da implantação dos sistemas iLPF, o solo da URT foi analisado quimicamente pela metodologia



Figura 1. Mapa dos estados que compõem a Amazônia Legal, evidenciando a cidade de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso. Fonte: adaptado de IMAZON (2017).

de EMBRAPA (2011), e os resultados das características químicas encontram-se na Tabela 1.

A partir dessa análise, o solo foi adubado, sendo que, entre os renques dos sistemas iLPF, a adubação foi feita visando atender às necessidades da cultura do arroz (*Oryza sativa* G. Watt), a primeira implantada na área de rotação. Nos renques, a adubação foi reduzida, pois a intenção inicial era de que as espécies florestais implantadas reciclassem os nutrientes do solo.

Nos três primeiros anos, foi feita a rotação de culturas entre os renques. No primeiro ano, a cultura implantada foi a do arroz na segunda safra, junto com as espécies florestais. No ano seguinte, a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) foi introduzida como cultura da primeira safra e, para a segunda, foram utilizados o arroz e o feijão (*Phaseolus*

vulgaris L.). No terceiro ano, a soja foi adotada mais uma vez na primeira safra e, na segunda, o consórcio milho (*Zea mays* L.) + capim (*Brachiaria ruziziensis* R. Germ. & C.M. Evrard). A partir de então, adotou-se o plantio de capim para pastagem, permitindo, assim, a entrada do componente animal nas áreas de integração.

Amostras de solo foram coletadas em seis sistemas iLPF, com a presença de eucalipto (*Eucalyptus urograndis* W. Hill ex Maiden) e de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), configurados em linhas simples, duplas e triplas. Duas áreas-controle foram selecionadas, uma com características de mata nativa e outra com um sistema de rotação soja/pastagem (Tabela 2). O solo foi coletado na profundidade de 0-20 cm, no final do período chuvoso (abril de 2013).

Tabela 1. Caracterização química do solo na URT da EMBRAPA Agrossilvipastoril dos sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta, na profundidade de 0-0,20 m, seguindo metodologia da EMBRAPA (2011). Legendas: MO = matéria orgânica; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca de cátions; V = saturação por bases.

pH	Ca	Mg	Al	H + Al	P	K	MO	SB	CTC	V
H ₂ O	cmol _c dm ⁻³				mg dm ⁻³		g dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³		%
5,3	1,3	0,6	0,2	6,0	4,4	53,9	20,6	55,9	61,9	40,1

Tabela 2. Descrição dos sistemas de manejo do solo avaliados na URT da EMBRAPA, fazenda Nova Gamada, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso.

Sistemas	Características
Linha simples de eucalipto (ES) Linha simples paricá (PS)	Faixa de 200 m de largura com povoamento de eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>) e paricá (<i>Schizolobium amazonicum</i>) em linhas únicas de 250 m de comprimento, com distância entre plantas de 3 m e distância entre subfaixas de 20 m, com plantio de soja (<i>Glycine max</i>) na safra, de milho (<i>Zea mays</i>) na safrinha e de <i>Brachiaria ruziziensis</i> na entressafra, nas entrelinhas
Linha dupla de eucalipto (ED) Linha dupla de paricá (PD)	Faixa de 200 m de largura com povoamento de eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>) e paricá (<i>Schizolobium amazonicum</i>), distribuídos em subfaixas compostas por duas linhas de 250 m de comprimento, separadas entre si por 3 m, com distância entre plantas de 3 m e distância entre subfaixas de 20 m, com plantio de soja (<i>Glycine max</i>) na safra, de milho (<i>Zea mays</i>) na safrinha e de <i>Brachiaria ruziziensis</i> na entressafra, nas entrelinhas
Linha tripla eucalipto (ET) Linha tripla de paricá (PT)	Faixa de 200 m de largura com povoamento de eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>) e paricá (<i>Schizolobium amazonicum</i>), distribuídos em subfaixas compostas por três linhas de 250 m de comprimento, separadas entre si por 3 m, com distância entre plantas de 3 m e distância entre subfaixas de 20 m, com plantio de soja (<i>Glycine max</i>) na safra, de milho (<i>Zea mays</i>) na safrinha e de <i>Brachiaria ruziziensis</i> na entressafra, nas entrelinhas
Rotação soja/pastagem (SP)	Área de mesmo tamanho dos sistemas iLPF com plantio de soja (<i>Glycine max</i>) na safra, de milho (<i>Zea mays</i>) na safrinha e de <i>Brachiaria ruziziensis</i> na entressafra, em sistema de plantio direto
Mata nativa (MN)	Área com mata nativa característica da região

Os renques de cada configuração de iLPF possuíam espaçamento de 20 m entre si e cada árvore florestal estava equidistante em 3 metros (Figura 2). Nos iLPF, o solo foi amostrado no sentido horizontal às espécies florestais que compõem os sistemas, coletando-se em sete pontos amostrais, sendo as amostras compostas por quatro subamostras, com pontos amostrais a 10 m, 6 m e 3 m das árvores e abaixo do pé da planta perene, totalizando 28 amostras por sistema integrado. Nos sistemas rotação soja/pastagem e mata nativa, foram delimitados quatro pontos amostrais aleatórios, sendo as amostras compostas por quatro subamostras.

EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE SOLO

O DNA total do solo foi extraído de 0,25 g de amostras de solo, em trélicas, utilizando *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratórios, Carlsbad, Canadá), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, a integridade e a qualidade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) com brometo de etídio e visualizadas em luz ultravioleta, utilizando-se como padrão molecular 2 µL do marcador *DNA Mass Ladder* (Invitrogen Life Technologies, Brasil). A concentração do DNA

extraído foi obtida em NanoDrop e o produto extraído foi purificado com o gel *Band Purification kit* (GE Healthcare).

ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS, ARQUEAS E FUNGOS

A quantificação da comunidade microbiana foi feita no equipamento *Step One Plus* (Applied Biosystems), utilizando o sistema de detecção SYBR® *Green*. As amplificações do gene 16S rDNA de bactérias foram feitas com os *primers* U968F (GCAACGAGAACCTTA) e 1387R (CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG) (Heuer *et al.*, 1997). Para o gene 16S de arqueas, as amplificações foram feitas com os *primers* ARC787f (ATTAGATACCCSBGTAGTCC) e ARC1059R (GCCATGCACCWCCTCT) (Yu *et al.*, 2005) e, para o gene 18S de fungos, foram utilizados os *primers* EF4f (GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG) e FUNG5r (GTA AAA GTC CTG GTT CCC) (Van Elsas *et al.*, 2000) (Tabela 3).

Todas as reações tinham um volume total de 10 µL, sendo 5 µL de Maxima SYBR *Green*/ROX qPCR Master Mix (2X) (*Thermo Scientific*), 1 µL de cada *primer* (5 pmol), 2 µL de água e 1 µL do DNA. Para cada um dos genes avaliados, foi construída uma curva padrão de clones de microrganismos conhecidos, para quantificação do número de cópias, usando diluição seriada de 10⁴ a 10⁹.

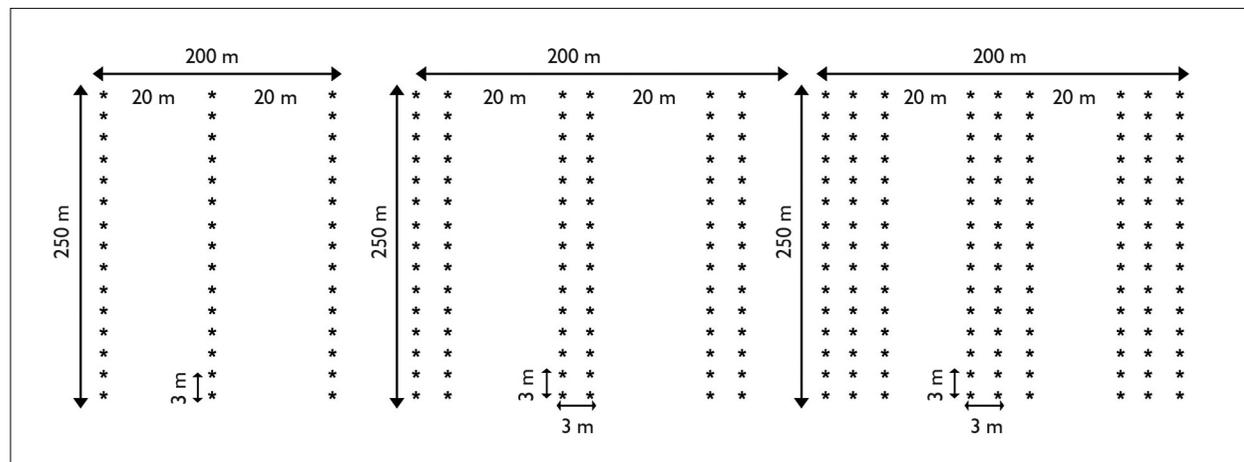


Figura 2. Croqui com a disposição dos tratamentos dos sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (iLPF), com a presença de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) e paricá (*Schizolobium amazonicum*), configurados em linha simples, pares de linhas e trios de linhas, instalados na fazenda Nova Gamada, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso, Brasil.

Tabela 3. Condições de corrida dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes 16S rDNA de bactéria, arqueas e 18S rDNA de fungos.

<i>Primers</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de corrida	Referência
U968f e 1387r	419	95 °C-10 min; 40 ciclos, 94 °C-15 s, 56 °C-30 s e 72 °C-45 s	Heuer <i>et al.</i> (1997)
ARC787f e ARC1059r	273	95 °C-10 min; 40 ciclos, 95 °C-15 s, 57 °C-20 s e 72 °C-30 s	Yu <i>et al.</i> (2005)
EF4f e FUNG5r	530	95 °C-5 min; 40 ciclos, 95 °C-15 s, 51 °C-30 s e 72 °C-1 min	Van Elsas <i>et al.</i> (2000)

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO

As características químicas (pH, Ca, Mg, Al, H + Al, P, K e matéria orgânica) do solo foram realizadas no Laboratório de Química do Solo e Planta da EMBRAPA Agrossilvipastoril. O pH foi determinado em água; os nutrientes Ca, Mg e Al foram extraídos por KCl; e o Mg, determinado por titulometria. A acidez potencial (H + Al) foi extraída de solução de acetato de cálcio e titulada com solução de NaOH 0,1 N. P e K foram extraídos com solução de Mehlich 1, sendo P determinado por fotocolorimetria e K por fotometria de emissão de chama. A matéria orgânica (MO) foi extraída por solução de dicromato de potássio e ácido sulfúrico, sendo titulada com sulfato ferroso amoniacal 0,5 N (EMBRAPA, 2011).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da qPCR foram obtidos pelo *StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems)*, sendo exportados deste para o programa Excel (Microsoft), onde foram calculados as quantidades de cópias dos genes para cada grama de solo seco e o erro padrão, gerado pela média das três repetições.

Visando comparações múltiplas da abundância de bactérias, de arqueas e de fungos do solo e dos atributos químicos do solo entre os diferentes sistemas de manejos avaliados, os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados não possuíam normalidade.

Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os sistemas adotados e a abundância de bactérias, arqueas e fungos do solo, foi utilizada a análise de variância multivariada (MANOVA). Os dados foram submetidos à

análise discriminante canônica (ADC) com o teste Lambda de Wilks e foram analisados com auxílio do pacote estatístico R® (R Core Team, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS, DE ARQUEAS E DE FUNGOS

A quantificação do número de cópias das comunidades-alvo em amostras de solo sob diferentes sistemas de manejo, por meio da qPCR, apresentou eficiência (E) de 100%, e os valores de regressão logarítmica (R^2) foram de 0,99 para bactérias e arqueas e de 0,98 para fungos.

Considerando os sistemas iLPF e suas configurações em linhas simples, dupla e tripla, nota-se variação entre a abundância de bactérias, de arqueas e de fungos dos solos analisados. A abundância de bactérias e de arqueas seguiu o mesmo padrão, tendo maior variabilidade entre os sistemas iLPF em linha simples (Figura 3).

As bactérias apresentaram número de cópias que variaram de $4,0 \cdot 10^8$ por grama de solo seco no sistema com eucalipto duplo (ED) a $1,1 \cdot 10^9$ no sistema soja/pastagem (SP) (Figura 3A). Para as arqueas, esses valores estiveram entre $1,4 \cdot 10^6$ cópias por grama de solo seco⁻¹ no sistema com eucalipto duplo (ED) a $3,6 \cdot 10^6$ e $3,4 \cdot 10^6$ cópias por grama de solo seco, respectivamente, nos sistemas com eucalipto simples (ES) e triplo (ET) (Figura 3B). Os fungos mostraram um comportamento diferenciado das bactérias e das arqueas, tendo maior variação entre os sistemas iLPF em linha tripla de paricá ($3,4 \cdot 10^5$ cópias por grama de solo seco⁻¹) e de soja/pastagem (SP), com $1,7 \cdot 10^5$ cópias por grama de solo seco (Figura 3C).

Com relação às cópias dos genes 16S rDNA das bactérias, observou-se apenas uma diferença estatística entre os números verificados no sistema soja/pastagem (SP), superior ao encontrado no sistema contendo eucalipto duplo (ED), mata nativa (MN), paricá simples (PS) e duplo (PD) (Figura 3A), com os demais sistemas (ES, ET e PT) apresentando quantidades de cópias intermediárias, sem diferenciação significativa entre eles e esses sistemas mencionados.

O sistema contendo eucalipto duplo também foi o que apresentou menores quantidades de cópias de 16S rDNA de arqueas, mas, nesse caso, não se diferenciou da encontrada nos sistemas PD, PS, PT e SP. A diferença significativa foi em relação às encontradas nos outros dois sistemas contendo eucalipto, o simples (ES) e o triplo (ET) e a mata nativa (MN), com os demais sistemas apresentando quantidades intermediárias, sem diferença significativa em relação aos demais (Figura 3B).

Estes resultados são coerentes com os obtidos por Silva *et al.* (2012), que verificaram que as práticas de manejo aplicadas aos solos agrícolas podem, em longo prazo, causar alterações na abundância de arqueas, principalmente dependendo da qualidade e da quantidade dos resíduos de culturas anteriores.

A quantificação do gene 16S rDNA foi capaz de indicar que arqueas são menos abundantes do que bactérias em todos os sistemas amostrados (estas últimas com valores de 10^9 cópias do gene 16S rDNA de bactérias por grama de solo seco, enquanto que arqueas possuem valores de 10^6 cópias deste mesmo gene por grama de solo seco).

Kemnitz *et al.* (2007), ao avaliarem solos ácidos de floresta na Alemanha, verificaram que arqueas apresentaram uma abundância média de 10^7 cópias por grama de solo, enquanto bactérias chegaram a 10^9 cópias do gene 16S rDNA por grama de solo.

Quanto às quantidades de cópias dos genes 18S rDNA referentes aos fungos, a única diferença significativa foi a observada entre o sistema paricá triplo (PT), apresentando menores números do que o observado no sistema soja/pastagem (SP). Os demais sistemas e a mata nativa (MN)

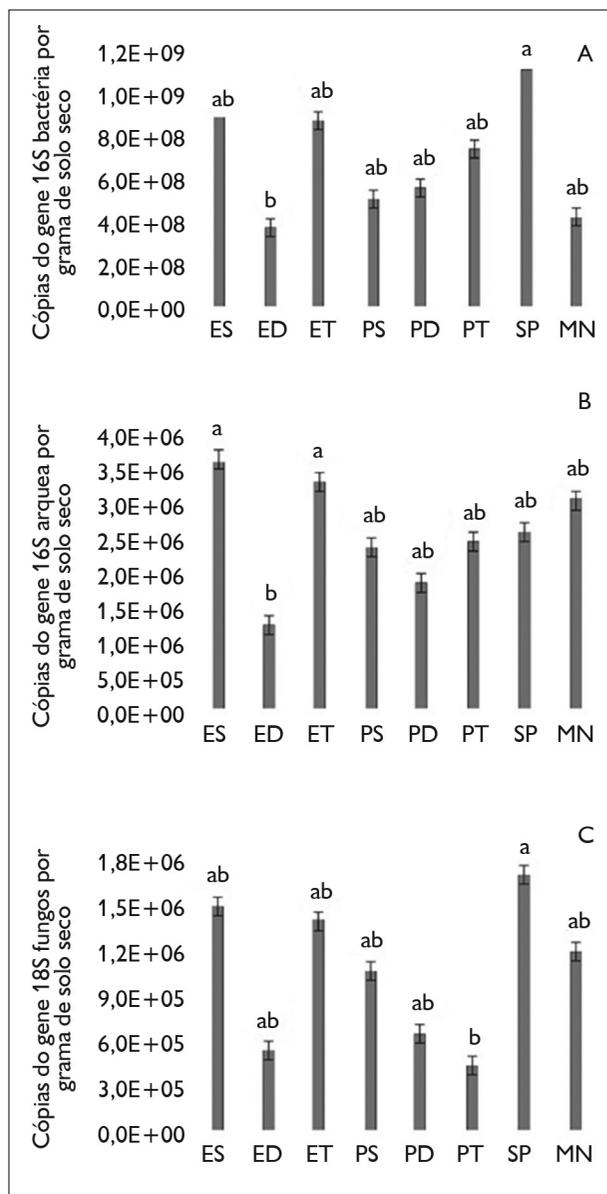


Figura 3. Número de cópias do gene 16S rDNA bactéria (A), 16S rDNA arquea (B) e 18S rDNA fungo (C) em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd), sob sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (ILPF) em linhas simples, dupla e tripla de paricá e eucalipto, rotação soja, pastagem e mata nativa, na profundidade de 0,0-0,20 cm, na fazenda Nova Gamada, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso. Os valores indicam a média das três repetições e as barras, o erro padrão gerado. Legendas: PS = paricá simples; PD = paricá duplo; PT = paricá triplo; ES = eucalipto simples; ED = eucalipto duplo; ET = eucalipto triplo; SP = rotação soja/pastagem; MN = mata nativa. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

apresentaram quantidades intermediárias, sem diferenciação estatística entre eles (Figura 3C).

A quantificação do gene 18S rDNA foi capaz de indicar que fungos são menos abundantes do que as bactérias e as arqueas (Fierer *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012) nos sistemas amostrados, com valores de 10^5 a 10^6 cópias do gene 18S rDNA de fungos por grama de solo seco. Nota-se que os diferentes tipos de manejo do solo têm grande influência sobre determinados grupos de microrganismos, uma vez que a microbiota é sensível às alterações causadas pelos sistemas de manejo e também pela disponibilidade de nutrientes (Figura 3).

A maior abundância de bactérias em rotação soja/pastagem (SP) pode estar relacionada ao manejo do solo, uma vez que ele tem suas propriedades químicas afetadas, acarretando consequências sobre a diversidade microbiana, podendo levar ao favorecimento, ou seja, à abundância de alguns grupos funcionais, provocando desequilíbrio (Mendes *et al.*, 2014).

No presente estudo, os teores de pH, P, H + Al, Mg e matéria orgânica apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os sistemas avaliados (Tabela 4).

O desenvolvimento dos microrganismos no solo pode ser influenciado por diversos fatores, tais como tipo do solo (Jangid *et al.*, 2010), fósforo e pH (Reardon *et al.*, 2014), os quais podem alterar a distribuição e a dinâmica destes microrganismos no ambiente.

Maiores teores de P nos sistemas iLPF (sendo o maior teor de $4,31 \text{ mg dm}^{-3}$ em paricá simples) sugerem que a ciclagem deste elemento está ocorrendo com maior intensidade nestas áreas em relação à rotação soja/pastagem ($0,89 \text{ mg dm}^{-3}$) (Tabela 4). Este resultado possivelmente está relacionado com a disponibilização de P pela atividade da degradação da matéria orgânica e pela morte dos microrganismos (Carneiro *et al.*, 2008).

Os teores de MO variaram de 1,64% em paricá linha tripla (PT) a 3,08% na mata nativa (MN). Diferenças significativas são observadas entre a mata nativa (MN), e os sistemas iLPF sob paricá (PS, PD e PT) e rotação soja/pastagem (SP), sistemas estes que provavelmente possuem menor deposição de resíduos vegetais de boa qualidade (Tabela 4).

Guareschi *et al.* (2012), avaliando a deposição de resíduos vegetais na superfície do solo do Cerrado em

Tabela 4. Caracterização química de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd) de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (iLPF) com a presença de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) e paricá (*Schizolobium amazonicum*), configurados em linhas simples, dupla e tripla, instalados na fazenda Nova Gamada, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso, Brasil. Legendas: PS = paricá simples; PD = paricá duplo; PT = paricá triplo; ES = eucalipto simples; ED = eucalipto duplo; ET = eucalipto triplo; SP = rotação soja/pastagem; MN = mata nativa; EP = erro padrão gerado pela média de triplicatas; MO = matéria orgânica. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Sistemas	pH		P		K		Al		H + Al		Ca		Mg		MO	
	H ₂ O		mg dm ⁻³				cmol dm ⁻³						%			
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
PS	5,87 ab	0,09	4,31 b	0,36	41,54 a	4,77	0,13 a	0,03	2,94 ab	0,11	1,70 a	0,15	0,84 ab	0,09	1,80 a	0,08
PD	5,75 ab	0,07	4,00 b	1,00	30,34 a	5,25	0,11 a	0,03	2,80 a	0,08	1,51 a	0,15	0,68 ab	0,07	1,86 a	0,10
PT	5,61 ab	0,07	2,67 ab	0,39	35,47 a	6,81	0,19 a	0,02	3,20 ab	0,09	1,40 a	0,12	0,78 ab	0,08	1,64 a	0,08
ES	5,60 ab	0,09	3,26 b	1,04	30,26 a	11,40	0,20 a	0,03	3,60 ab	0,13	1,50 a	0,14	0,69 ab	0,10	2,04 ab	0,08
ED	5,70 ab	0,09	2,20 ab	0,56	47,77 a	11,56	0,10 a	0,03	3,30 ab	0,14	1,90 a	0,15	0,81 ab	0,10	2,13 ab	0,08
ET	5,55 ab	0,09	1,96 ab	0,29	37,11 a	10,62	0,15 a	0,03	3,30 ab	0,11	1,50 a	0,12	0,66 ab	0,07	2,19 ab	0,08
SP	5,90 b	0,05	0,89 a	0,50	36,13 a	3,80	0,30 a	0,05	3,25 ab	0,23	1,28 a	0,06	0,28 a	0,14	1,90 a	0,09
MN	5,21 a	0,34	2,92 ab	0,81	56,76 a	9,41	0,15 a	0,02	3,65 b	0,32	1,66 a	0,07	0,89 b	0,07	3,08 b	0,28

diferentes sistemas de manejo, obtiveram baixa produção de resíduos na área de pastagem, atribuindo isso a fatores como baixa produtividade e pastoreio intensivo.

Os teores de H + Al apresentaram diferenças entre os sistemas paricá duplo (PD) e mata nativa (MN), tendo uma variação de 2,80 cmol dm⁻³ a 3,65 cmol dm⁻³, respectivamente (Tabela 4). A acidez potencial (H + Al) dos solos tem relação direta com a MO presente e sugere boas condições de aporte em solos (Ebeling *et al.*, 2008).

A conversão de florestas naturais em pastagens pode ser acompanhada por homogeneização das comunidades microbianas, provavelmente devido a um número reduzido de substratos de boa qualidade (Rodrigues *et al.*, 2013), diferentemente do que ocorrem nas áreas preservadas, onde se tem matéria orgânica diversificada e de qualidade.

Henry *et al.* (2006) usaram a quantidade total de genes ribossomais para normalizar a quantidade de genes funcionais em amostras de solo, descrevendo a abundância do gene 16S rDNA de bactérias em valores entre 10⁸ a 10⁹ cópias por grama de solo. Com base nesse padrão e nos diferentes manejos, pode-se afirmar que o solo abriga uma abundante comunidade de bactérias, sendo importante o conhecimento de genes específicos desses sistemas, a fim de quantificar essas espécies.

O pH no sistema SP foi o mais elevado (5,9) (Tabela 4), o que pode afetar a composição da comunidade microbiana, por modular a disponibilidade de nutrientes no solo e influenciar diretamente complexos enzimáticos que fazem parte da nutrição dos microrganismos do solo (Lauber *et al.*, 2013).

Ao analisar o efeito conjunto das variáveis obtidas por qPCR (número de cópias dos genes 16S rDNA dos domínios Bacteria e Arquea e 18S rDNA para Fungi), por meio da análise discriminante canônica (ADC) e do teste estatístico Lambda de Wilks pela MANOVA, verificou-se que existe diferença significativa entre os sistemas de manejo do solo avaliados ($p < 0,05$), e também que a primeira variável canônica (dimensão 1) explica 80,9% da variação total dos dados, sendo que as duas funções canônicas

(dimensão 1 e 2) explicaram 96,3% da máxima variação total dos dados moleculares (Figura 4).

O efeito conjunto das variáveis que mediram a abundância dos grupos bactéria, arquea e fungo resulta em maior sensibilidade da análise multivariada em separar as áreas de estudo, identificando diferenças significativas. Percebe-se que o estudo multivariado da abundância de microrganismos apresenta alta sensibilidade às diferenças de manejo peculiares a cada um dos sistemas, permitindo, ainda, boa separação (Figura 4).

No entanto, a separação entre as iLPF de eucalipto simples e triplo (ES e ET) apresenta menor nitidez, o que indica grande semelhança entre esses sistemas, na consideração desses atributos, sendo que ES e ET assemelham-se a MN (Figura 4). A vegetação é um dos fatores que afeta a composição da comunidade microbiana (Reardon *et al.*, 2014), podendo ser observada diferença significativa entre as espécies florestais adotadas nos sistemas iLPF, o que deixa evidente que cada sistema possui suas características próprias e micro-habitats específicos.

Observa-se diferença no número de cópias dos genes de bactérias, de arqueas e de fungos, podendo-se inferir que a densidade de cópias desses genes foi sensível ao sistema de manejo do solo adotado (Figura 4). Resultados contrastantes foram observados por Kuramae *et al.* (2011). Avaliando diferentes sistemas de uso da terra por meio de ferramentas moleculares, os autores concluíram que os fatores físico-químicos do solo explicam melhor a variação nas comunidades bacterianas do que o tipo de vegetação e as práticas de uso da terra, com exceção em floresta de pinheiros e em pastagens naturais.

Nos sistemas avaliados, houve maior influência do tipo de vegetação. Provavelmente, os sistemas iLPF contribuem com a microbiota, por se tratarem de sistemas ambientalmente corretos, sustentáveis e resilientes, conferindo uma estrutura microbiológica diferenciada. A literatura demonstra que o manejo do solo determina a composição das comunidades de microrganismos desse ambiente (Fierer *et al.*, 2005; Wallenius *et al.*, 2011; Osborne *et al.*, 2011).

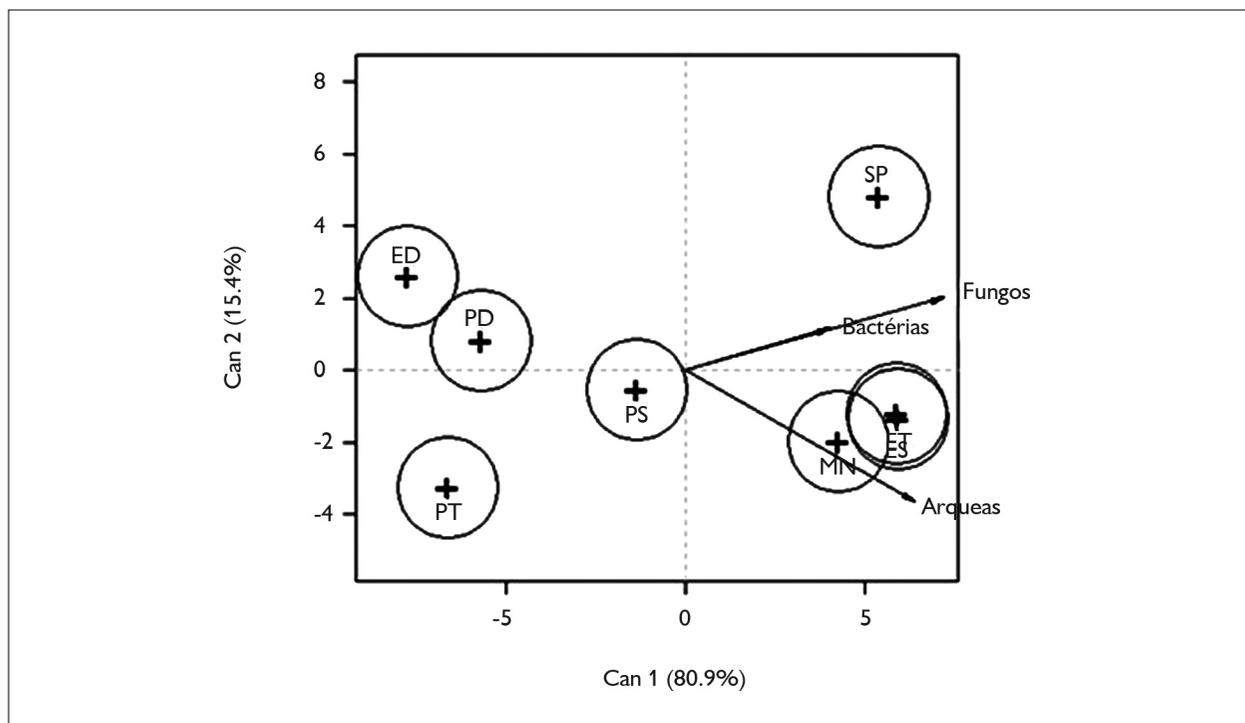


Figura 4. Análise discriminante canônica do número de cópias dos genes 16S rDNA bactérias, 16S arqueas e 18S rDNA fungos em um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd), sob sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (iLPF) em linha simples, dupla e tripla de paricá e de eucalipto, rotação soja pastagem e mata nativa, na profundidade de 0,0-0,20 cm, na fazenda Nova Gamada, município de Nova Canaã do Norte, Mato Grosso. Legendas: PS = paricá simples; PD = paricá duplo; PT = paricá triplo; ES = eucalipto simples; ED = eucalipto duplo; ET = eucalipto triplo; SP = rotação soja/pastagem; MN = mata nativa.

Romaniuk *et al.* (2011) avaliaram diferentes indicadores de qualidade do solo, observando que as comunidades microbianas são mais sensíveis às mudanças no uso do solo do que às propriedades físico-químicas, o que é corroborado no presente estudo, uma vez que a abundância dos microrganismos avaliados explica 96,3% da máxima variação total dos dados, conseguindo separar bem as particularidades de cada sistema iLPF adotado.

Suleiman *et al.* (2017), ao compararem uma área de mata nativa a um pasto, observaram que diferenças nas comunidades de bactérias e arqueas podem ter sido ocasionadas pelos atributos do solo ou pela modificação da vegetação dominante. Os resíduos depositados sobre a superfície e os exsudatos das raízes suplementam os microrganismos do solo com diferentes níveis, quantidade e qualidade de matéria orgânica proveniente das diferentes

plantas (Borges, 2015), o que acarreta diferenças na abundância dos microrganismos do solo e explica a diferença entre os manejos do solo avaliados neste estudo.

Maiores abundâncias de bactérias e de fungos em SP também podem estar relacionadas à excreta de animais depositadas no solo, disponibilizando rapidamente fontes de N, C e P, além da própria planta ter favorecido a liberação de exsudatos, o que resulta em melhor alfadiversidade e riqueza microbiana nestes ambientes do que em ambientes naturais (Rodrigues *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES

A abundância de bactérias, de arqueas e de fungos é regulada e moldada de acordo com os diferentes sistemas de manejo do solo, com a vegetação e com arranjos em linhas dos sistemas iLPF.

A abundância de fungos foi a que apresentou maior variação entre os sistemas e a mata nativa, podendo servir de parâmetro de comparação de estabilidade e de condições ambientais.

A abundância de bactérias não se mostrou apropriada para a comparação de estabilidade e de condições ambientais dos sistemas estudados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Agrisus, pelo financiamento do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos cedida à primeira autora.

REFERÊNCIAS

AGRITEMPO, 2016. **Sistema de monitoramento agrometeorológico**. EMBRAPA Informática Agropecuária/CEPAGRI-Meteorologia UNICAMP. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agritempo/produtos.jsp?siglaUF=GO>>. Acesso em: 16 fevereiro 2016.

ARAÚJO, F. S., A. A. C. SALVIANO, L. F. C. LEITE, Z. M. SOUZA & A. C. M. SOUSA, 2010. Physical quality of a yellow Latosol under integrated crop-livestock system. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 34(3): 717-723. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000300013>>.

BORGES, C. D., 2015. **Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem microbiana associados às emissões de gases de efeito estufa sob diferentes usos da terra**: 1-105. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARNEIRO, M. A. C., P. C. R. ASSIS, L. B. C. MELO, H. S. PEREIRA, H. B. PAULINO & A. N. SILVEIRA NETO, 2008. Atributos bioquímicos em dois solos de Cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 38(4): 276-283.

EBELING, A. G., L. H. CUNHA DOS ANJOS, D. V. PEREZ, M. G. PEREIRA & G. S. VALLADARES, 2008. Relação entre acidez e outros atributos químicos em solos com teores elevados de matéria orgânica. **Bragantia** 67(2): 429-439. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000200019>>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 2011. **Manual de métodos de análises de solos**: 2-230. EMBRAPA Solos/Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 2013. **Sistema brasileiro de classificação de solos**: 3-353. EMBRAPA, Brasília.

FIERER, N., J. A. JACKSON, R. VILGALYS & R. B. JACKSON, 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology** 71(7): 4117-4120. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>>.

GUARESCHI, R. F., M. G. PEREIRA & A. PERIN, 2012. Deposição de resíduos vegetais, matéria orgânica leve, estoques de Carbono e Nitrogênio e Fósforo remanescente sob diferentes sistemas de manejo no cerrado goiano. **Revista Brasileira de Ciências Solo** 36(3): 909-920. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832012000300021>>.

HENRY, S., D. BRU, B. STRES, S. HALLET & L. PHILIPPOT, 2006. 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** 72(8): 5181-5189. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00231-06>>.

HEUER, H., M. KRSEK, P. BAKER, K. SMALLA & E. M. H. WELLINGTON, 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology** 63(8): 3233-3241.

HUNKE, P., R. ROLLER, P. ZEILHOFER, B. SCHRÖDER & E. N. MUELLER, 2015. Soil changes under different land-uses in the Cerrado of Mato Grosso, Brazil. **Geoderma Regional** 4: 31-43. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2014.12.001>>.

INSTITUTO DO HOMEM E MEIO AMBIENTE DA AMAZÔNIA (IMAZON), 2017. **Mapas: Amazônia Legal**. Disponível em: <<http://amazon.org.br/mapas/amazonia-legal/>>. Acesso em: 21 novembro 2017.

JANGID, K., M. A. WILLIAMS, A. J. FRANZLUEBBERS, J. M. BLAIR, D. C. COLEMAN & W. B. WHITMAN, 2010. Development of soil microbial communities during tallgrass prairie restoration. **Soil Biology and Biochemistry** 42(2): 302-312. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.008>>.

KEMNITZ, D., S. KOLB & R. CONRAD, 2007. High abundance of *Crenarchaeota* in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology Ecology** 60(3): 442-448. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00310.x>>.

KURAMAE, E. E., E. YERGEAU, L. C. WONG, A. S. PIJL, J. A. VAN VEEN & G. A. KOWALCHUK, 2011. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology** 79(1): 12-24. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>>.

LAIZ, L., A. ROMANOWSKA-DESKINS & C. SAIZ-JIMENEZ, 2011. Survival of a bacterial/aecheal consortium on building materials as revealed by molecular methods. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65: 1100-1103.



- LAUBER, C. I., K. RAMIREZ, Z. AANDERUD, J. LENNON & N. FIERER, 2013. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal** 7(8): 1641-1650. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.50>>.
- LOSS, A., E. C. RIBEIRO, M. G. PEREIRA & E. M. COSTA, 2014. Atributos físicos e químicos do solo em sistemas de consórcio e sucessão de lavoura, pastagem e silvipastoreio em Santa Teresa, ES. **Bioscience Journal** 30(5): 1347-1357.
- MARACAHIPES, L., E. LENZA, B. S. MARIMON, E. A. D. OLIVEIRA, J. R. R. PINTO & B. H. MARIMON JUNIOR, 2011. Estrutura e composição florística da vegetação lenhosa em cerrado rupestre na transição Cerrado-Floresta Amazônica, Mato Grosso, Brasil. **Biota Neotropica** 11(1): 133-141. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032011000100013>>.
- MENDES, L. W., E. E. KURAMAE, A. A. NAVARRETE, J. A. VAN VEEN & S. M. TSAI, 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal** 8(8): 1577-1587. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.17>>.
- MORALES, S., T. COSART & W. HOLBEN, 2010. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal** 4(6): 799-808. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.8>>.
- OSBORNE, C. A., A. B. ZWART, L. M. BROADHURST, A. G. YOUNG & A. E. RICHARDSON, 2011. The influence of sampling strategies and spatial variation on the detected soil bacterial communities under three different land-use types. **FEMS Microbiology Ecology** 78(1): 70-79. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01105.x>>.
- PLASSART, P., M. A. VINCESLAS, C. GANGNEUX, A. MERCIER, S. BARRAY & K. LAVAL, 2008. Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 127(3-4): 286-293. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.04.008>>.
- R CORE TEAM, 2017. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 27 janeiro 2017.
- REARDON, C. L., H. T. GOLLANY & S. B. WUEST, 2014. Diazotrophic community structure abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations. **Soil Biology and Biochemistry** 69: 406-412. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.038>>.
- RODRIGUES, J. L. M., V. H. PELLIZARI, R. MULLER, K. BAEK, C. JESUS, F. S. PAULA, B. MIRZA, G. S. HAMAOU, S. M. TSAI, B. FEIGL, J. M. TIEDJEG, B. J. BOHANNAN & K. NUSSLEIN, 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 110(3): 988-993. DOI: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1220608110>>.
- ROMANIUK, R., L. GIUFFRÉ, A. COSTANTINI, N. BARTOLONI & P. A. NANNIPIERI, 2011. Comparison of indexing methods to evaluate quality of soils: the role of soil microbiological properties. **Soil Research** 49(8): 733-741. DOI: <<https://doi.org/10.1071/SR11147>>.
- ROUSK, J., P. C. BROOKES & E. BAATH, 2010. Investigating the mechanisms for the opposing pH-relationships of fungal and bacterial growth in soil. **Soil Biology and Biochemistry** 42(6): 926-934. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.009>>.
- SILVA, M. C. P., A. C. F. DIAS, J. D. VAN ELSAS & J. F. SALLES, 2012. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. **PLoS ONE** 7(12): e51554. DOI: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051554>>.
- SULEIMAN, A. K. A., V. S. PYLRO & L. F. W. ROESCH, 2017. Replacement of native vegetation alters the soil microbial structure in the Pampa biome. **Scientia Agricola** 74(1): 77-84. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2015-0494>>.
- VAN ELSAS, J. D., F. G. DUARTE, A. KEIJZER-WOLTERS & E. SMIT, 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods** 43(2): 133-151.
- VANLAUWE, B., A. BATIONO & J. CHIANU, 2010. Integrated soil fertility management: operational definition and consequences for implementation and dissemination. **Outlook on Agriculture** 39(1): 17-24. DOI: <<http://dx.doi.org/10.5367/000000010791169998>>.
- WALLENIUS, K., H. RITA, A. MIKKONEN, K. LAPPI, K. LINDSTRÖM, H. HARTIKAINEN, A. RAATELAND & R. M. NIEMI, 2011. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. **Soil Biology & Biochemistry** 43(7): 1464-1473. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.018>>.
- WANG, G. & F. CAO, 2011. Integrated evaluation of soil fertility in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) agroforestry systems in Jiangsu, China. **Agroforestry Systems** 83: 89-100. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s10457-011-9399-y>>.
- YU, Y., C. LEE, J. KIM & S. HWANG, 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering** 89(6): 670-679. DOI: <<https://doi.org/10.1002/bit.20347>>.