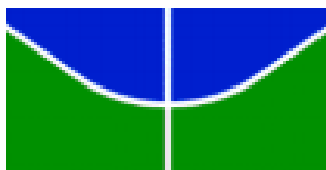


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM ÁREA DE CERRADO SENTIDO RESTRITO A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE ADIÇÃO DE NUTRIENTES**

Rafaella Silveira Sousa
Orientadora: Prof^a. Dr.^a Mercedes Maria da Cunha Bustamante
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília-DF
Setembro de 2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM ÁREA DE CERRADO SENTIDO RESTRITO A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE ADIÇÃO DE NUTRIENTES**

Rafaella Silveira Sousa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Doutorado em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª Mercedes Maria da Cunha Bustamante

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger

Brasília-DF
Setembro de 2020

Agradecimentos

À minha orientadora Dr^a Mercedes Bustamante, obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Obrigada pela confiança, pelo apoio e por ter me inspirado ao longo de todos esses anos. Seu trabalho, dedicação e competência foram e sempre serão um grande exemplo. Obrigada Mercedes!

Ao meu co-orientador, Dr^o Ricardo Krüger, agradeço imensamente sua contribuição neste trabalho. Obrigada por ser tão humano, pela sua prontidão e atenção em todos os momentos. Você é uma inspiração para mim. Obrigada Krüger!

À Regina Sartori, obrigada pelo apoio, paciência, pela sua presença diária e contribuição no meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo! Em especial, obrigada pela amizade que só cresceu ao longo destes anos. Seu carisma e competência são uma inspiração para a vida!

Aos membros da banca examinadora, muito obrigada a cada um de vocês pela disponibilidade e por agregarem tanto valor a este trabalho com todo o conhecimento de vocês.

À FAPDF e ao CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e à CAPES pela bolsa de estudo.

Thiago Mello, como te agradecer por tanto apoio neste estudo (discussão de dados, descomplicando o R, montagem de figuras e tantas coisas mais)? Não tenho nem palavras que consigam expressar minha gratidão... Muito obrigada por tudo, por tudo mesmo!

À Michelle Wong, uma pesquisadora espetacular e um ser humano único, de coração imenso. Obrigada pela oportunidade de conhecê-la, por toda ajuda com o inglês, pela interação e amizade. Você é uma importante referência para mim.

A todos do laboratório de Ecologia de Ecossistemas, em especial Letícia, Alexandra, Núbia, Waira, Jéssica, Francisco, Leandro. Pessoas que estiveram comigo diariamente compartilhando risadas, cafés e muitos momentos especiais. Vocês nem tem ideia do quanto aprendi com cada um. Obrigada pela amizade, pelo apoio e carinho de vocês.

Ao grupo do Laboratório de Enzimologia. Muito obrigada por me receberem tão bem e aturarem minhas opiniões ecológicas sobre tudo!

Fernando, Gabriel e pessoal do Laboratório de Interação Plantas-Praga. Muito obrigada pelo suporte na clonagem, preparação e interpretação dos dados da qPCR.

Às maravilhosas Carla Vizzotto e Helena Ipê. Cada conversa, cada apoio, troca de ideias, experiências compartilhadas com vocês me tornaram uma pessoa mais forte e mais confiante. Obrigada pela presença e parceria de cada uma.

Aos amigos de estradas passadas, mas que nunca deixaram de estar presentes com sua alegria e torcida: Aynoã, Rafa Durão, Pollyanne. Que saudade de vocês! Obrigada por permanecerem na minha vida.

À uma pessoa muito especial que tive honra de encontrar por aqui: Luana Bicalho! Nem sei como te agradecer por todo seu apoio e carinho. Sem você a caminhada teria sido muito mais difícil. Muito obrigada por toda ajuda nas inúmeras etapas desafiadoras durante esse processo. À Verônica Pires, uma grande amiga que também encontrei nesse DF... Obrigada pela torcida e confiança de sempre!

À família Campos: Sr. Campos, Dona Ana, Jussara, Moema. Sem vocês nada disso estaria acontecendo agora. Muito obrigada pelo incentivo e por terem me recebido com tanto carinho no início dessa jornada.

À minha família, minha mãe Marly e meu irmão João Paulo. Obrigada mãe pelo seu apoio e amor incondicional. Por acreditar em mim e ter a certeza de que eu chegaria onde estou, antes mesmo que isso fosse um projeto de vida para mim. Ao meu irmão, obrigada pelo apoio, preocupação e cuidado.

À Deus, ao universo, às boas energias que me impulsionaram a chegar até aqui. Por fim, obrigada a todos que de maneira direta ou indireta estiveram presentes e envolvidos nessa conquista tão importante para mim. Muitíssimo obrigada!

***“We know more about the movement of
celestial bodies than about the soil
underfoot”***

Leonardo da Vinci

*Àquela que sempre acreditou e confiou
em mim: minha mãe Marly, dedico.*

Lista de figuras

- Fig. 1** Esquema do conteúdo gerado nesta tese, cujo eixo central está relacionado as respostas da microbiota do solo às alterações promovidas pela adição de nutrientes em um experimento de longo prazo estabelecido em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os tratamentos são: C – controle, sem adições; Ca – calagem; N – adição de nitrogênio; NP – adição de nitrogênio e fósforo; P – adição de fósforo. *Os dados da vegetação foram disponibilizados por Mello (2019). 6
- Fig. 2** Esquema do histórico experimental de adição de nutrientes no solo de uma área de cerrado típico. Temas de alguns estudos realizados na área ao longo do tempo são apontados. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 9
- Capítulo 1**
- Fig. 1** Distribuição da precipitação mensal acumulada (mm) entre 2017 e 2018. Dados da estação climatológica da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Dados de janeiro de 2018 não coletados. As setas indicam os meses das coletas no presente estudo. 36
- Fig. 2** Diferenças sazonais no teor gravimétrico de água no solo (TG, %) e nos valores de temperatura (°C) do solo (0-10 cm) mensurados durante as estações chuvosa e seca de 2018 na área do experimento de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As linhas associadas aos asteriscos indicam as diferenças na comparação entre as estações. ANOVA; * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. 46
- Fig. 3** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade bacteriana em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosas de 2017 **(a)** e 2018 **(b)** indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). 48
- Fig. 4** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade de Archaea em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosa **(a)** e seca de 2017 **(b)** e da estação chuvosa de 2018 **(c)** são indicadas pela cor azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). 49
- Fig. 5** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade de fungos em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosa **(a)** e seca de 2017 **(b)** e da estação chuvosa de 2018 **(c)** são indicadas pela cor azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). 50
- Fig. 6** Distribuição do número de sequências não quiméricas atribuídas aos domínios Archaea e Bacteria antes da aplicação dos filtros para remoção de sequências espúrias (singletons, “mitocôndria”, “cloroplasto” e não classificadas). 51
- Fig. 7** Curvas de rarefação da comunidade bacteriana obtida por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras de solo (0-10cm) das parcelas do experimento de adição de nutrientes, nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), e adição de fósforo (P). 52
- Fig. 8** Média acumulada do número de ASVs assinadas para cada *taxa* por tratamento **(a)** e abundância relativa por parcela **(b)** dos 17 filós representativos da comunidade bacteriana (abundantes e raros) 53

- do solo no experimento de adição de nutrientes durante as estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico, localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: Controle (C), Calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP); adição de fósforo (P).
- Fig. 9** Heatmap e dendrograma (UPGMA) dos filos bacterianos cuja abundância relativa diferiu entre os tratamentos de adição de nutrientes **(a)**. Resumo esquemático dos filos que aumentaram e/ou diminuíram sua proporção em cada tratamento em relação ao controle **(b)**. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Amostras das estações chuvosa (rainy) e seca (dry) de 2018. Parcelas representadas por números seguidos da inicial do tratamento e estação. Tratamentos: Controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). Maiores detalhes no Material Suplementar (Fig. S6). 54
- Fig. 10** Medidas de α -diversidade da comunidade bacteriana presente nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes, durante as estações chuvosa **(a)** e seca **(b)** de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças na comparação múltipla entre os tratamentos. ANOVA; * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. 65
- Fig. 11** Medidas de α -diversidade da comunidade bacteriana do solo (0-10 cm) associada às estações chuvosa vs. seca de 2018 nos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** Controle (C); **b)** calagem (Ca); **c)** adição de nitrogênio (N); **d)** adição de nitrogênio e fósforo (NP); **e)** adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças entre as estações para cada tratamento. ANOVA, * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. 66
- Fig. 12** Diversidade filogenética (Faith's PD) da comunidade bacteriana presente no solo (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes durante as estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: Controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças na comparação múltipla entre os tratamentos nas duas estações **(a)** e entre estações para cada tratamento **(b)**. ANOVA, * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. 67
- Fig. 13** Análise de ordenação das comunidades bacterianas associadas ao solo (0-10cm) de diferentes tratamentos de adição de nutrientes nas estações chuvosa e seca de 2018. **a)** Ordenação de Coordenadas Principais (PCoA) usando distância UniFrac ponderada. **b)** Análise canônica de Coordenadas Principais com base em RDA (e distância Bray-Curtis) entre pares de amostras e sua relação com diferentes variáveis ambientais (edáficas – $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, TG – teor gravimétrico; e da vegetação – herbáceas C4 nativa e exótica). Área de cerrado típico, no experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 68
- Fig. 14** Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Proteobacteria** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em "Others". Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 70
- Fig. 15** Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Acidobacteria** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em "Others". Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 71

- Fig. 16** Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Chloroflexi** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em “Others”. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 72
- Fig. 17** Distribuição de Archaea em solos (0 – 10 cm) de cerrado submetidos à adição de nutrientes nas estações chuvosa e seca de 2018. **a)** abundância acumulada; **b)** abundância relativa; estimadores de riqueza e diversidade durante as estações chuvosa **(c)** e seca **(d)**; **e)** análise canônica de coordenadas principais com base em RDA (e distância Bray-Curtis) entre pares de amostras e sua relação com diferentes variáveis ambientais (edáficas – N-NO_3^- , N-NH_4^+ , TG – teor gravimétrico; e da vegetação – herbáceas C4 nativa e exótica). Área de cerrado típico, no experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 74
- Fig. S1** Mapa de vegetação da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR-IBGE). O quadrado preto representa o local onde se encontra a área do experimento de adição de nutrientes de longa duração. Fonte: Silva, 2012. 142
- Fig. S2** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades bacterianas do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período. Os asteriscos (*) indicam as amostras selecionadas para sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram incluídas no envio, as amostras da estação seca de 2018 referentes às mesmas parcelas (não demonstradas no gráfico). 143
- Fig. S3** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades de Archaea do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período. 144
- Fig. S4** Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades de fungos do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período. 145
- Fig. S5** Número de sequências anotadas dentro dos domínios Archaea **(a)** e Bacteria **(b)** após aplicação de todos os filtros de qualidade. As sequências foram obtidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de solo (0-10 cm) de um experimento de adição de nutrientes coletadas nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os tratamentos são: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). 146
- Fig. S6** Membros comunidade bacteriana do solo (0-10cm) em nível taxonômico de filo cujas diferenças na proporção média entre os tratamentos de um experimento de adição de nutrientes foram significativas ($p < 0,05$). Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As barras coloridas destacam os tratamentos de adição 147

| | | |
|-------------------|--|-----|
| | de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - roxo), adição de fósforo (P - rosa). | |
| Fig. S7 | Estimadores de diversidade da comunidade bacteriana do solo (0 - 10 cm) em uma área experimental de adição de nutrientes de longo prazo, localizada na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil, durante as estações chuvosa e seca de 2018. N – adição de nitrogênio; P – adição de fósforo; NP – adição de nitrogênio e fósforo; Ca – calagem; Control – controle | 148 |
| Fig. S8 | Diferentes métodos de ordenação da comunidade bacteriana do solo (0 -10 cm) em solos de diferentes tratamentos de adição de nutrientes, nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. N – adição de nitrogênio; P – adição de fósforo; NP – adição de nitrogênio e fósforo; Ca – calagem; Control – controle. | 148 |
| Capítulo 2 | | |
| Fig. 1 | Principal components analysis (PCA) ordination of standardized chemical parameters from composite topsoil samples (0-10 cm depth) of the control (C) and liming (Ca) plots in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. a) The rainy season of 2017, 11 years after the last lime addition; b) The rainy season of 2018, four months after liming. | 99 |
| Fig. 2 | Rarefaction curves of 16S rRNA sequencing depth and detected ASVs number in each soil sample (0-10 cm). Samples were collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil, where long-term fertilization experiment is located. Ca – liming plots. | 100 |
| Fig. 3 | α -diversities measures of the bacterial and archaeal communities in topsoil samples (0-10 cm) of the control and liming (Ca) treatments in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. a) Bacterial diversity in the rainy season; b) Bacterial diversity in the dry season; c) Archaeal diversity between treatments. Significant differences between treatments are indicated by lowercase letters with respective <i>p</i> -values inside the plot. Significant differences between seasons for each treatment are indicated by capital letters, with respective <i>p</i> -values outside the plot. Only significant differences are highlighted ($p < 0.05$). | 101 |
| Fig. 4 | Differences in abundances of microbial communities at phylum level between control and liming (Ca) soils (0-10cm) in a typical cerrado in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. a) Bacterial mean proportion; b) Archaeal mean proportion. Only significant differences are showed ($p < 0.05$). | 102 |
| Fig. 5 | Bacterial hierarchical taxonomic composition of the most representative taxa in topsoil samples (0-10 cm) of the control and liming (Ca) treatments, at seven taxonomic levels (initial filter by abundance at phyla level $> 10\%$). a) Dominant taxa in the rainy season; b) dominant taxa in the dry season. Long-term nutrient addition experiment in a typical cerrado located in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Green colors indicate more abundant taxa in the control and gold colors indicate more abundant taxa in the liming. Node size represents the relative proportions for that taxon. | 104 |
| Fig. 6 | Microbial taxa correlation with environmental variables from topsoil (0-10cm; Spearman, $p < 0.05$) collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a long-term nutrient addition experiment installed in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. a) Bacterial phylum; b) Relevant taxa affiliated to the four most abundant bacterial groups in different taxonomic levels (Proteobacteria and Actinobacteria: at the genus level, Acidobacteria: at the order level, and Chloroflexi: at class level); c) Archaeal phylum. Only significant environmental variables are shown for each group with their respective correlation score. | 106 |
| Fig. 7 | KEGG functional categories comparisons between control and liming plots related to soil samples (0-10 cm) collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. a) Analysis of the principal components ordination (PCA), and b) Dendrogram clustering of KEGG distribution along treatment and seasons; c) Differences ($p < 0.05$; effect size > 2) in functional profiles associated with carbon, nitrogen, and sulfur metabolism pathways. Differences in mean proportions based on KEGG abundances between treatments. The vertical dashed green line indicates control. Horizontal dashed lines divide the metabolic pathways. KEGG identifiers are listed, followed by their respective enzyme-coding genes. | 108 |
| Fig. S1 | Final number of 16S rRNA analyzed reads in soil samples (0-10 cm) from control and liming (Ca) treatments in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil, during the rainy and dry seasons of 2018. a) Total number of reads per sample represented by bar and number of | 159 |

reads assigned to Bacteria and Archaea domains represented by points. **b)** Proportion of reads assigned to Bacteria and Archaea in the entire dataset.

Capítulo 3

- Fig. 1** Schematic representation of major pathways in the N cycle occurring in the atmosphere-soil interface. The microbial genes involved in each step are indicated. The values in the figure represent the fluxes in the N budget measured for the cerrado sensu stricto described in a review by Bustamante et al. (2006). Anammox, anaerobic ammonia oxidation; DNRA, dissimilatory nitrate reduction to ammonium; Norg, organic nitrogen. Assimilatory processes indicated by dashed arrows. Dissimilative processes indicated by solid arrows. Decomposition are indicated by colored solid arrows. 120
- Fig. 2** Soil moisture **(a)** and temperature variation **(b)** between rainy and dry seasons of 2018 and Spearman's correlation between soil moisture and temperature **(c)**. Soils (0 – 10 cm depth) were collected in a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. 125
- Fig. 3** A hierarchical taxonomy of Proteobacteria members obtained from 16S rRNA gene in the soil samples (0 - 10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. The grey tree on the right represents a key for the unlabeled trees. Each of the smaller trees represents a comparison among the treatments in the columns and rows. Node size represents the relative proportions for that taxon. A taxon colored brown is more abundant in treatment in the column, and taxon colored green is more abundant in treatment of the row. Control – untreated control; liming; N: nitrogen addition; NP: nitrogen and phosphorus addition; P: phosphorus addition. 128
- Fig. 4** Relative quantities of *nifH* gene in the soil samples (0 – 10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. Control – untreated control; Ca: liming; N: nitrogen addition; NP: nitrogen and phosphorus addition; P: phosphorus addition. 128

Lista de tabelas

Capítulo 1

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Descrição dos tratamentos experimentais de adição de nutrientes da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil, com as respectivas quantidades aplicadas nos solos. | 36 |
| Tabela 2 | Relação dos oligonucleotídeos iniciadores empregados para amplificação do espaço intergênico em Bacteria, Archaea e Fungos e do gene 16S rRNA em Bacteria e Archaea. | 40 |
| Tabela 3 | Propriedades químicas do solo (0 – 10 cm) coletados na estação chuvosa de 2017, 11 anos após a última fertilização, em experimento de longa duração de adição de nutrientes localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os resultados são apresentados como médias ± desvio padrão. Números em negrito destacam os maiores valores de cada parâmetro observado entre os tratamentos. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: dição e fósforo. | 43 |
| Tabela 4 | Propriedades químicas dos solos (0-10 cm) mensuradas durante a estação chuvosa de 2018 em diferentes tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As diferentes letras representam as diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos ± desvio padrão ($n = 3$). Maiores valores destacados em negrito. Variáveis transformadas (BoxCox) para análise estatística indicadas com asterisco (*). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). ANOVA, teste TukeyHSD para comparação de médias. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: dição e fósforo. | 45 |
| Tabela 5 | Propriedades químicas dos solos (0-10 cm) mensuradas durante as estações chuvosa e seca de 2018 nos tratamentos do experimento de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As diferentes letras representam as diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos ± desvio padrão ($n = 3$). Os asteriscos (*) destacam as diferenças sazonais ($p < 0,05$) para cada tratamento. ANOVA, teste TukeyHSD para comparação de médias. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: dição e fósforo. | 45 |
| Tabela 6 | Abundância relativa (%) das famílias e ordens pertencentes às classes afiliadas a Proteobacteria nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), Calagem (Ca), adição nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em “Outros”. | 57 |
| Tabela 7 | Abundância relativa (%) das famílias e ordens pertencentes às classes afiliadas a Acidobacteria nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), Calagem (Ca), adição nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em “Outros”. | 62 |
| Tabela 8 | Abundância relativa (%) das famílias e ordens pertencentes às classes afiliadas a Chloroflexi nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), Calagem (Ca), adição nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em “Outros”. | 63 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela S1 | Abundância relativa (%) das famílias dentro dos filos pertencentes a Archaea nos solos (0-10cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração e, área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de e nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em “Outros”. | 149 |
|------------------|--|-----|

Capítulo 2

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Table S1 | Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy season of 2017, 11 years after the last limestone addition. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between control and Ca based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns. | 154 |
| Table S2 | Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy or dry season of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between control and Ca based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns. Red asterisks point to differences between rows | 155 |
| Table S3 | Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy season of 2017 and 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between 2017(after 11 years without liming) and 2018 (four months after liming resumption) based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns. | 156 |
| Table S4 | Correlation scores (with the four axes) from the Analysis of the principal components (PCA) ordination of standardized physical and chemical parameters from composed soil samples (0-10 cm) of the control (C) and liming (Ca) collected during the rainy season in 2017 and 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. | 157 |
| Table S5 | Relative abundances (%) of Bacterial and Archaeal communities from the soil (0-10 cm) in the control and liming (Ca) treatments. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. p-values, mean and also total percentage are showed. | 157 |
| Table S6 | General KEGG functional categories associated with microbial composition control and liming soils from a long-term experimental area cerrado. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. | 158 |

Capítulo 3

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Table 1 | Primer sets used to amplification of 16S rRNA and nifH genes from soil samples (0-10 cm) in a long-term nutrient addition experimental area in cerrado, Brasília, Brazil. | 124 |
| Table 2 | Chemical properties of soil (0-10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected in a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error ($n = 4$). | 126 |
| Table S1 | The ten significant alignments (> 200 bp) on BLAST <i>nifH</i> cloned fragment based on the Nucleotide collection (nt) database. | 161 |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| RESUMO GERAL | 1 |
| GENERAL ASBSTRACT | 3 |
| ESTRUTURA DA TESE | 5 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 7 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| Padrões gerais de distribuição da comunidade microbiana: o que podemos considerar para o Cerrado? | 13 |
| Composição da comunidade microbiana em solos de Cerrado: o que sabemos? | 14 |
| O ciclo do nitrogênio | 17 |
| <i>Fixação biológica</i> | 18 |
| REFERÊNCIAS | 20 |
| HIPÓTESES | 29 |
| OBJETIVOS | 30 |
| Objetivo geral | 30 |
| Objetivos específicos | 30 |
| Capítulo 1 – Efeitos de longo prazo da adição de nutrientes sobre a diversidade da microbiota associada ao solo em uma área nativa do Cerrado | 31 |
| RESUMO | 31 |
| ABSTRACT | 32 |
| INTRODUÇÃO | 33 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| Área de estudo | 34 |
| Coletas | 36 |
| Avaliação dos atributos químicos do solo | 37 |
| Análises moleculares | 38 |
| <i>Extração de DNA</i> | 38 |
| <i>Análise do perfil das comunidades microbianas por meio de PCR-RISA</i> | 38 |
| <i>Sequenciamento</i> | 40 |
| Dados da vegetação | 41 |
| Análises de diversidade microbiana e análises estatísticas | 41 |
| RESULTADOS | 42 |
| Efeitos de longo e curto prazo das adições de nutrientes no solo | 42 |
| Análise do perfil das comunidades microbianas por meio de PCR-RISA | 46 |
| Caracterização da comunidade microbiana do solo | 51 |
| <i>Bactéria</i> | 51 |
| <i>Caracterização em nível taxonômico de família</i> | 55 |
| <i>i. Proteobacteria</i> | 55 |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 55 |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 56 |
| <i>Deltaproteobacteria</i> | 56 |
| <i>ii. Acidobacteria</i> | 58 |
| <i>Acidobacteriia</i> | 58 |
| <i>Blastocatellia (Subgroup 4)</i> | 59 |
| <i>Subgroup 6</i> | 59 |
| <i>Thermoanaerobaculia</i> | 60 |
| <i>iii. Chloroflexi</i> | 60 |
| <i>AD3</i> | 60 |
| <i>Ktedonobacteria</i> | 60 |
| <i>TK10</i> | 61 |

| | |
|--|------------|
| <i>Anaerolineae</i> | 61 |
| α -diversidade | 64 |
| β -diversidade | 67 |
| Archaea | 73 |
| DISCUSSÃO | 75 |
| Alterações dos atributos químicos do solo | 75 |
| Alterações no perfil da comunidade microbiana | 76 |
| Efeitos de longo prazo da adição de nutrientes sobre a abundância, riqueza e estrutura padrões de diversidade da microbiota | 76 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| <i>Chapter 2 - Long-term liming promotes drastic changes in the composition of the microbial community in a tropical savanna soil</i> | 92 |
| ABSTRACT | 93 |
| INTRODUCTION | 93 |
| MATERIAL AND METHODS | 95 |
| Experimental area | 95 |
| DNA extraction and sequencing | 96 |
| Data processing | 96 |
| Other statistical analyses | 98 |
| RESULTS | 98 |
| Long and short-term effects of liming on soil chemical properties | 98 |
| Microbial community diversity | 100 |
| Microbial community composition | 101 |
| Bacterial taxonomic diversity | 102 |
| Drivers of microbial community composition | 105 |
| Functional predictions | 107 |
| DISCUSSION | 108 |
| Long and short-term effects of liming in soil | 108 |
| Microbial community diversity | 109 |
| Microbial community composition, taxonomic diversity and environmental drivers | 109 |
| Microbial functional profile | 111 |
| CONCLUSIONS | 112 |
| REFERENCES | 112 |
| <i>Chapter 3 - Seasonal and long-term effects of nutrient additions and liming on the potential activity of nitrogen fixation in Cerrado soils</i> | 117 |
| ABSTRACT | 117 |
| INTRODUCTION | 117 |
| MATERIAL AND METHODS | 121 |
| Experimental area | 121 |
| Soil sampling | 121 |
| Soil chemical and physical properties | 121 |
| DNA extraction, PCR, cloning and sequencing | 122 |
| Taxonomic links | 122 |
| Quantitative PCR (qPCR) | 123 |
| Statistical analysis | 123 |
| RESULTS | 124 |
| Soil parameters | 124 |
| Taxonomy characterization of <i>nifH</i> gene and 16S rRNA taxonomic links | 127 |
| Seasonal and nutrient addition effects on microbial N fixation potential | 127 |
| DISCUSSION | 129 |
| REFERENCES | 131 |
| MATERIAL SUPPLEMENTAR | 140 |

Resumo Geral

Solos são ecossistemas complexos que abrigam elevada biodiversidade. O Cerrado, segundo maior bioma da América do Sul e savana tropical caracterizada por uma variedade de formações vegetais, detém sobre seus solos ácidos e distróficos enorme riqueza biológica. As implicações das propriedades químicas do solo sobre a estrutura das comunidades vegetais no bioma são bem conhecidas, mas informações a respeito de como esses fatores atuam sobre a diversidade microbiana e sobre processos ecológicos mediados por microrganismos no solo ainda são escassas. No presente estudo, foram combinadas técnicas de *fingerprinting*, sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA, predição funcional e quantificação de genes *nifH* para avaliar as respostas das comunidades microbianas do solo (0 - 10 cm) às alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes em uma área de cerrado típico sob vegetação nativa submetida à adição experimental de fertilizantes químicos e calagem. O experimento iniciado em 1998, consiste em cinco tratamentos de adição de nutrientes: **1)** Controle, sem adições; **2)** Ca: calagem; **3)** N: adição de nitrogênio; **4)** NP: adição de nitrogênio e fósforo em conjunto, e **5)** P: adição de fósforo. As aplicações dos fertilizantes foram realizadas por oito anos consecutivos, seguidos de um intervalo de 11 anos sem novas adições e uma aplicação adicional dos mesmos fertilizantes após esse período. As coletas de solo foram realizadas nas estações chuvosa e seca de 2017 (representando 11 anos de intervalo desde a última adição) e 2018 (representando o período de quatro e nove meses após a retomada das adições). Os resultados mostraram forte efeito residual das adições passadas sobre as propriedades químicas do solo que persistiram com o mesmo padrão em 2018: alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes entre os tratamentos experimentais comparados ao controle, especialmente no tratamento com calagem. Esses resultados indicam que os efeitos de longo prazo foram mais determinantes para as mudanças observadas que os prováveis efeitos de curto prazo. As mudanças no solo, juntamente com a sazonalidade da precipitação, culminaram em diferentes impactos sobre a composição, diversidade e distribuição das comunidades de Bacteria e Archaea. Foram encontradas diferenças na comunidade microbiana associada ao solo já em nível de filo e uma elevada variabilidade nas respostas entre as subdivisões taxonômicas dentro de cada filo, com alguns *taxa* aumentando ou reduzindo em abundância e outros encontrados exclusivamente em um único tratamento. Os estimadores ecológicos de diversidade apontaram um aumento na diversidade bacteriana nos solos do tratamento Ca nas estações chuvosa e seca, enquanto a diversidade de Archaea foi maior nos tratamentos N, NP e P. Sazonalmente, maior diversidade bacteriana foi encontrada durante a estação seca nos tratamentos N e Ca. Análises de β -diversidade com base na distância ponderada UniFrac indicou diferenças na composição da microbiota associada aos solos. Essas diferenças foram relacionadas principalmente ao pH, tipo de vegetação presente, concentrações de amônio e teor gravimétrico de água nos solos. Contrariamente aos estimadores de diversidade, a predição funcional baseada no gene 16S rRNA sugeriu a redução na abundância de diferentes

enzimas relacionadas às vias metabólicas do carbono, enxofre e nitrogênio no tratamento Ca. Corroborando este último resultado, houve uma redução na quantidade relativa de genes *nifH* neste tratamento. Também houve redução no número de genes *nifH* entre os tratamentos N, NP e P. Durante a estação seca, a quantidade relativa de genes *nifH* diminuiu em solos dos tratamentos controle, N e NP. O conjunto de resultados gerados no presente estudo destacam os consistentes impactos de longo prazo das adições de nutrientes sobre o pH do solo e, conseqüentemente, sobre a microbiota e suas funções ecológicas. Foram observadas pronunciadas alterações na comunidade microbiana e sugere-se que o aumento da diversidade ecológica e taxonômica na área experimental pode estar mais relacionado à sobreposição de nichos ecológicos e redundância funcional. Além disso, considerando que mesmo após 11 anos sem novas adições de nutrientes os atributos do solo permaneceram alterados na área experimental juntamente com a potencial redução nos aspectos funcionais observados, os resultados representam indicadores preliminares, mas significativos, de potenciais riscos ecológicos associados a respostas da comunidade microbiana em solos perturbados.

Palavras-chave: Solos tropicais, limitação por nutrientes, sazonalidade da precipitação, diversidade microbiana, diversidade funcional, ciclo do nitrogênio.

General Abstract

Soils are complex ecosystems that harbor high biodiversity. The Cerrado, a tropical savannah characterized by a variety of plant formations, support enormous biological richness on its acidic and dystrophic soils. The implications of these chemical properties on the plant community structure in the biome are well known, but information about how these factors act on microbial diversity and under ecological processes mediated by microorganisms in the soil is still scarce. In the present study, we combined fingerprinting techniques, 16S rRNA gene high-throughput sequencing, functional prediction, and quantification of *nifH* genes to assess the topsoil (0 -10 cm) microbial communities responses to changes in pH and nutrient availability in a typical cerrado area under native vegetation subjected to experimental addition of chemical fertilizers and liming. The experiment implemented in 1998, consists of five nutrient addition treatments: **1)** Control, without additions; **2)** Ca: liming; **3)** N: addition of nitrogen; **4)** NP: addition of nitrogen plus phosphorus, and **5)** P: addition of phosphorus. Fertilizer applications were performed for eight consecutive years, followed by an interval of 11 years without new additions and an additional application of the same fertilizers after that period. The soil collections were carried out in the rainy and dry seasons of 2017 (representing 11 years apart since the last nutrient addition) and 2018 (representing the period of four and nine months after the resumption of additions). The results showed pronounced residual effects of past additions on the chemical properties of the soil that persisted with the same pattern in 2018: changes in pH and nutrient availability between experimental treatments compared to control, especially in liming. These results indicate that the long-term effects were more determinant for the observed changes than the likely short-term effects. The changes in the soil, together with the seasonality of precipitation, culminated in different impacts on the composition, diversity, and distribution of the communities of Bacteria and Archaea. Were found differences in the microbial community associated with soil already at the phylum level and high variability in the responses between taxonomic subdivisions within each phylum, with some taxa increasing or decreasing in abundance and others found exclusively in a single treatment. Ecological diversity estimators pointed to an increase in bacterial diversity in the liming treatment soils in the rainy and dry seasons, while the Archaea diversity was greater in the N, NP, and P treatments. Seasonally, greater bacterial diversity was found during the dry season in the N and liming treatments. B-diversity analyzes based on the weighted distance UniFrac indicated differences in the soil microbiome composition. These differences were mainly related to pH, vegetation type, ammonium concentrations, and gravimetric water content in soils. Contrary to diversity estimators, the functional prediction based on the 16S rRNA gene suggested the reduction in different enzyme-encoding genes abundance associated with metabolic pathways in carbon, sulfur, and nitrogen cycles in liming treatment. Corroborating this last result, we show a reduction in the relative amount of *nifH* genes in this treatment. Also, there was a reduction in the number of *nifH* genes in N, NP, and P treatments. Furthermore,

there was a reduction in *nifH* gene quantities during the dry season in the control, N, and NP treatments. Our set of results highlights the consistent long-term impacts of nutrient additions on soil pH and, consequently, on the microbiota and its ecological functions. We demonstrate pronounced changes in the microbial community and suggest that the increase in ecological and taxonomic diversity in the experimental area could be related to the overlapping of ecological niches and functional redundancy. Furthermore, considering that even after 11 years without new nutrient additions, the soil attributes remained altered in the experimental area together with the potential reduction in the observed functional aspects, our results represent preliminary, but significant, indicators of potential environmental risks associated with responses microbial community in disturbed soils.

Keywords: Tropical soils, nutrient limitation, precipitation seasonality, microbial diversity, functional diversity, nitrogen cycle

Estrutura da tese

Este estudo está estruturado em cinco seções que compreendem a introdução geral, o levantamento bibliográfico e três capítulos, entre os quais apresentamos as principais respostas da comunidade de bactérias e arqueias à adição de nutrientes em um experimento de longa duração estabelecido em uma área de cerrado típico. Também discutimos os efeitos interativos das mudanças nas propriedades do solo e vegetação, como efeitos direcionadores das respostas da microbiota do solo, bem como consideramos os efeitos da variação sazonal da precipitação. Com esses dados, trouxemos *insights* a respeito do potencial funcional da microbiota e destacamos como a fertilização pode afetar importantes funções mediadas pelos microrganismos que habitam o solo.

Na introdução geral apontamos os principais aspectos da estrutura e organização dos ecossistemas, com especial ênfase nas características do solo e do clima que atuam como vetores da biodiversidade da flora no Cerrado. Com base nessa descrição, contextualizamos como as alterações nessas características influenciam o componente biótico acima do solo por meio do histórico de 21 anos do experimento de adição de nutrientes, área em que o presente estudo foi desenvolvido, e apontamos as lacunas que ainda existem no conhecimento sobre o componente biótico associado ao solo (microbiota). No tópico seguinte, trouxemos uma ampla revisão bibliográfica destacando os estudos que envolveram a caracterização da microbiota do solo em diferentes fitofisionomias do Cerrado e levantamos questões ecológicas a respeito de importantes ciclos biogeoquímicos, particularmente o ciclo do nitrogênio, que é ainda pouco discutido neste cenário. De forma mais específica, os capítulos subsequentes descrevem toda a pesquisa envolvida no presente estudo. O **Capítulo 1** contextualiza os efeitos da adição de nutrientes e da sazonalidade sobre a composição, abundância, riqueza e diversidade da comunidade microbiana nos cinco tratamentos da área experimental. Considerando as peculiaridades nas respostas da microbiota do solo associada ao tratamento com calagem, o **Capítulo 2** traz um recorte e uma discussão mais detalhada sobre as alterações na composição e sobre o comportamento da comunidade microbiana neste tratamento, em uma abordagem que integra os aspectos da diversidade taxonômica aos principais preditores ambientais associados às alterações na abundância dos grupos. Neste capítulo, também indicamos os potenciais efeitos da calagem sobre funções mediadas pela microbiota nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre por meio do emprego de ferramentas de predição funcional baseada no gene 16S rRNA. Todas as informações geradas nos capítulos anteriores são complementadas com o **Capítulo 3**, no qual sintetizamos os efeitos da adição de nutrientes (considerando novamente todos os cinco tratamentos) sobre o potencial da microbiota na fixação de nitrogênio por meio do estudo do gene *nifH*. Em termos gerais, o esquema abaixo (Fig. 1) sintetiza o conteúdo gerado neste estudo.

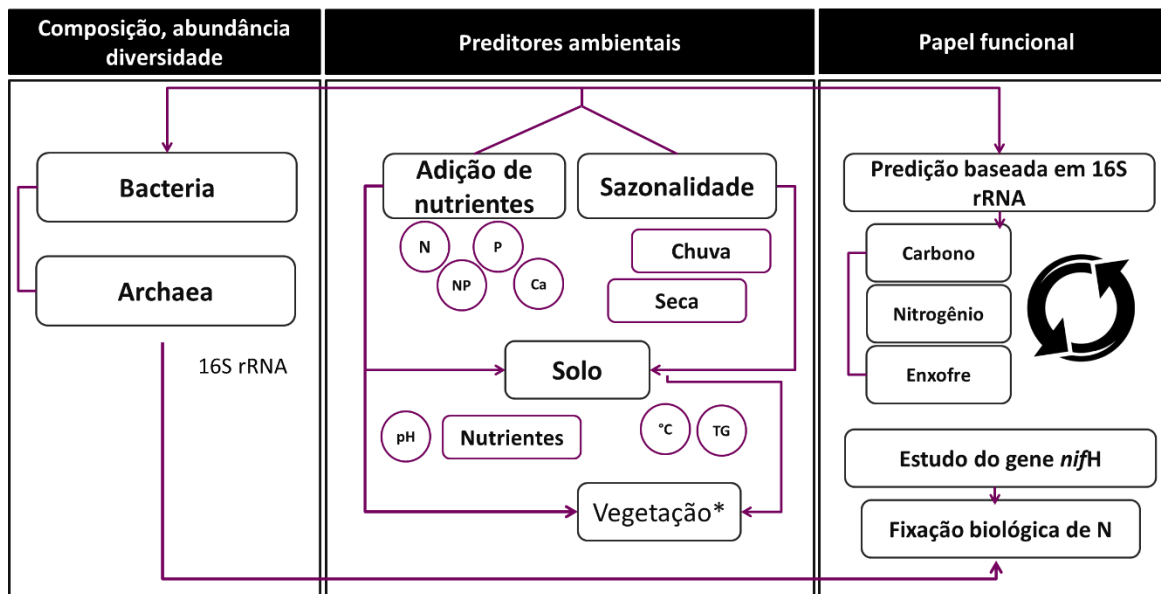


Fig. 1 Esquema do conteúdo gerado nesta tese, cujo eixo central está relacionado as respostas da microbiota do solo às alterações promovidas pela adição de nutrientes e calagem em um experimento de longo prazo estabelecido em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os tratamentos são: N – adição de nitrogênio; NP – adição de nitrogênio e fósforo; P – adição de fósforo; Ca – calagem e controle – sem adições. *Dados de vegetação disponibilizados por Mello (2019). TG – Teor gravimétrico de água no solo.

Introdução Geral

Os ecossistemas terrestres são estruturados por múltiplos processos ecológicos modulados por variáveis climáticas, pelas propriedades edáficas, pelo regime de distúrbios, pela biota presente e suas interações (Chapin et al., 2011). A dinâmica entre estes componentes é considerada um vetor central para a distribuição e estrutura da vegetação em todos os biomas no mundo (Bond et al., 2004). Entre estes biomas, o Cerrado, segundo maior bioma da América do Sul, compreende uma das mais ricas e biodiversas savanas tropicais, sendo caracterizado por um mosaico de fitofisionomias que incluem formações florestais, savânicas e campestres (Eiten, 1972; Ribeiro and Walter, 2008). A distribuição e estrutura da vegetação nas diferentes formações do Cerrado são potencialmente influenciadas pelas variações sazonais no balanço hídrico (Lima and Silva, 2008; Silva et al., 2008) e pela disponibilidade de nutrientes nos solos (Medina, 1993; Reatto et al., 2008). Enquanto a limitação por água no bioma é regulada especialmente pela sazonalidade bem marcada no regime de chuvas (Silva et al., 2008), a limitação por nutrientes é frequentemente associada às propriedades do solo, geralmente antigos, altamente intemperizados, argilosos, ácidos e pobres em nutrientes como nitrogênio e fósforo (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008). A importância relativa desses controles sobre a heterogeneidade do Cerrado e de outras savanas tem sido amplamente estudada por pesquisadores que buscam compreender como as alterações nestas limitações preditivas modificam os atributos dos solos, influenciam as respostas da biota acima do solo e se associam às mudanças globais (Jacobson et al., 2011; Lannes et al., 2016; Medina, 1993; Staver, 2017; van der Waal et al., 2009). Embora a influência desses vetores seja bem reconhecida na determinação da composição e distribuição das comunidades vegetais, ainda não é claro quão generalizado são estes efeitos sobre a composição e diversidade de microrganismos do solo ou quão impactante o aumento na disponibilidade de nutrientes pode ser sobre processos ecológicos, como a ciclagem biogeoquímica do nitrogênio.

A remoção da limitação por água e nutrientes em solos de Cerrado pode afetar a composição florística, a densidade e a dominância das espécies, resultando em consequências sobre a diversidade e funcionamento dessas savanas (Bucci et al. 2006; Kozovits et al. 2007; Jacobson et al. 2009). Isto porque a sazonalidade da precipitação no bioma pode ter contribuído para o desenvolvimento de estratégias adaptativas em plantas lenhosas nativas, como por exemplo, no incremento em raízes para o acesso à água em camadas mais profundas do solo ao longo da estação seca (Oliveira et al., 2005; Sarmiento et al., 1985). Além disso, a baixa fertilidade nesses solos poderia apresentar potencial influência sobre a seleção de espécies com menor requerimento nutricional que apresentam maior capacidade competitiva sob condições distróficas (Bustamante et al. 2012).

Para determinar como os ecossistemas no Cerrado são influenciados pela limitação na disponibilidade de água e de nutrientes no solo, um experimento de adição de nutrientes foi instalado em uma área de cerrado típico, dentro da Reserva Ecológica (RECOR) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em Brasília-

DF (Jacobson et al., 2011; Kozovits et al., 2007). O experimento está inserido no âmbito do projeto “Estudo dos efeitos das mudanças globais que determinam a estrutura e funcionamento de ecossistemas do Cerrado” (Silva, 2012). Este projeto foi enquadrado dentro da proposta do Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD), iniciado em 1996, em uma iniciativa para estudar e acompanhar a dinâmica das interações ecológicas ao longo do tempo sob a ótica da conservação da biodiversidade e uso sustentável dos recursos naturais em diferentes regiões do Brasil (<http://www.peld.unb.br/>).

O experimento de adição de nutrientes foi inicialmente estabelecido em 1998 e consiste em cinco tratamentos diferenciados de adição de nutrientes (ou fertilização): **1) C**: controle, sem adição de nutrientes; **2) Ca**: calagem; **3) N**: adição de nitrogênio; **4) NP**: adição de nitrogênio e fósforo combinados, e **5) P**: adição de fósforo. A calagem é uma prática agrícola comum em solos tropicais, utilizada para correção do pH, redução das concentrações de alumínio (Al_3^+) e aumento na disponibilização de nutrientes para as plantas (Haynes 1982; Fageria and Baligar 2008), o que tornou interessante a inclusão desse tratamento na área experimental. Foram realizadas aplicações bianuais dos fertilizantes, no início e no final da estação chuvosa, no período entre 1998 e 2006, ano em que houve a última adição de nutrientes na área (Garofalo, 2001; Jacobson et al., 2011) antes do intervalo de aplicações. A aplicação dos fertilizantes foi realizada a lanço e sobre a serapilheira para reduzir as perdas de nutrientes pelo sistema, em quantidades iguais nas parcelas e em uma área envolvente com 1 m de largura (Garofalo, 2001). Foram observadas três queimadas acidentais na área ao longo do tempo; a primeira ocorreu em 1994 (anterior à instalação do experimento), a segunda em 2005, sete anos após o estabelecimento do estudo (Silva 2012) e a terceira em 2011. Após as duas últimas queimadas acidentais, as parcelas foram reinstaladas nos mesmos locais (Jacobson et al., 2011) (Fig. 2).

Desde sua implantação, muitos aspectos ecológicos relacionados aos efeitos da adição de nutrientes sobre os solos e vegetação na área do experimento já foram abordados. Antes da primeira fertilização em 1998, os solos das parcelas não apresentavam diferenças significativas em termos de concentração de nutrientes e tinham uma estrutura de vegetação semelhante (Kozovits et al., 2007). Nos primeiros 50 cm do solo, o pH era ácido, em torno de 4,2 e os níveis de P disponível, N total e matéria orgânica (MO) eram de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.kg}^{-1}$, respectivamente (Bucci et al., 2006).

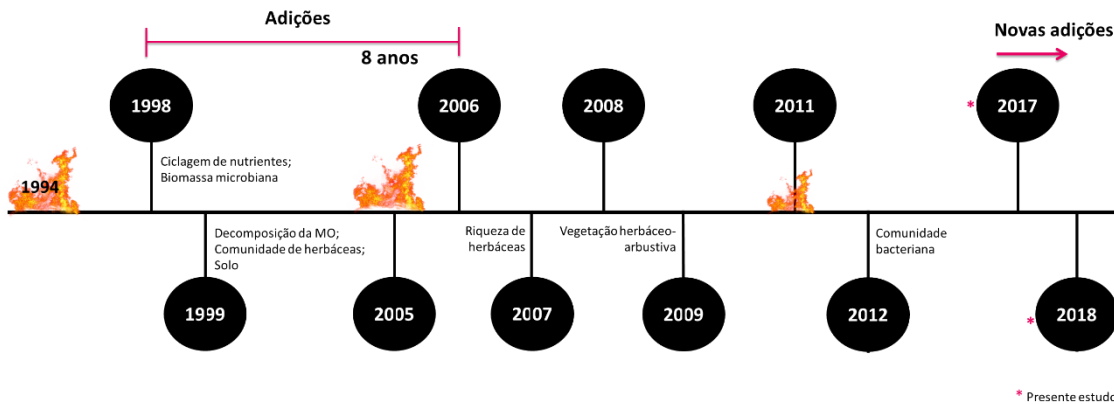


Fig. 2 Esquema do histórico experimental de adição de nutrientes no solo de uma área de cerrado típico. Temas de alguns estudos realizados na área ao longo do tempo são apontados. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição e fósforo (P).

Logo durante o primeiro ano de adição foram observadas alterações no processo de ciclagem de nutrientes entre o sistema solo-planta como resposta de curto prazo à adição de nutrientes (Garofalo, 2001). Análises do solo realizadas em 1999, por exemplo, indicaram que adição conjunta de N e P acelerou as taxas de decomposição da matéria orgânica (Garofalo 2001; Kozovits et al. 2007), aumentou a disponibilidade de N inorgânico, favoreceu o aumento da biomassa microbiana com aumento da densidade de bactérias e do número de colônias de fungos crescidos em meios de cultura (Garofalo 2001). Alterações em processos ecológicos também foram observadas através da redução nas taxas de emissão de gases nitrogenados oriundos do processo de denitrificação (Jacobson et al. 2011). No tratamento NP houve uma redução no pH do solo, aumento da concentração de P disponível e nas concentrações de amônio (NH_4^+) (Kozovits et al. 2007; Jacobson et al. 2011; Bustamante et al. 2012). Sobre a vegetação, a adição de conjunta de N e P resultou na diminuição da retranslocação de nutrientes pelas plantas (Kozovits et al., 2007) e afetou tanto o estrato herbáceo-arbustivo quanto o estrato arbóreo. No estrato herbáceo, a adição destes nutrientes favoreceu a invasão pela gramínea exótica *Melinis minutiflora* P. Beauv., popularmente conhecida como capim gordura (de Mello et al., 2014). Já no estrato arbóreo, houve incremento foliar e em área basal em algumas espécies (Bucci et al., 2006; Simpson Junior, 2002), alterações na anatomia do xilema e de outras estruturas da arquitetura hidráulica vegetal que resultaram no aumento da eficiência do uso de água por algumas espécies arbóreas neste tratamento, assim como no tratamento com adição de P (Costa, 2019).

No início das adições, entre outubro de 1998 e outubro de 1999, o tratamento com adição de N favoreceu o aumento da imobilização do N inorgânico e o aumento do carbono na biomassa microbiana

(Garofalo, 2001). Nos anos seguintes, os principais efeitos da adição de N nos solos foram a acidificação do pH, aumento das concentrações de N inorgânico, especialmente na forma de NH_4^+ (Kozovits et al. 2007; Bustamante et al. 2012) e aumento nas concentrações de alumínio (Al_3^+) (Jacobson et al., 2011). Na vegetação, a adição de N provocou o aumento da biomassa da gramínea nativa *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase (popularmente conhecida por capim flexinha) (de Mello et al., 2014), a alteração da arquitetura hidráulica em algumas espécies arbóreas (Bucci et al., 2006), favoreceu a menor perda de água pelas folhas durante a noite (Scholz et al., 2007), reduziu a riqueza florística no estrato herbáceo-arbustivo (de Mello et al., 2014) e a diversidade no estrato arbustivo-arbóreo (Jacobson et al., 2011).

No tratamento de adição de P, os teores de P disponíveis aumentaram cerca de três vezes nos solos (Kozovits et al. 2007). Assim como no tratamento de adição de N, a adição de P isoladamente levou a mudanças na morfologia e biomassa de raízes, cujo processo foi especialmente modulado pela variação sazonal na umidade do solo (de Mello et al., 2014). Também houve redução no número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associados à área de influência da raiz de espécies lenhosas dominantes na área (Martins, 2019). A adição de P reduziu a riqueza florística quando comparado ao tratamento controle (de Mello et al., 2014). Quando P é adicionado sozinho ou em combinação com N, há uma facilitação da invasão pela gramínea exótica *M. minutiflora* com consequente redução da biomassa da gramínea nativa *E. inflexa* e outras gramíneas nativas (Bustamante et al. 2012). No estrato arbóreo-arbustivo, respostas espécie-específica foram observadas, como alterações nas concentrações de enxofre (S), fenóis e taninos em grupos funcionais de plantas brevidécidas e sempre verdes (Jacobson and Bustamante, 2019). Foram encontrados ainda efeitos sobre as interações da vegetação com outros níveis tróficos, por exemplo, a adição de P e N, isolados ou em conjunto, favoreceram a indução de galhas por insetos em folhas da espécie *Eremanthus glomerulatus* Less. (Cuevas-Reyes et al., 2011). Em síntese, os efeitos combinados da aplicação de N e P foram mais acentuados que os efeitos individuais desses elementos, sugerindo uma co-limitação por ambos (Jacobson et al. 2011).

Nos estudos realizados na área experimental, o tratamento Ca foi considerado em um menor número de estudos, embora seja o tratamento onde ocorreu as alterações mais marcantes. Efeitos sobre os processos de ciclagem observados no início das adições de nutrientes indicaram que a calagem resultou na aceleração das taxas de decomposição da MO e no aumento da densidade de bactérias, assim como em NP (Garofalo, 2001). Em solos coletados no ano de 2009, Silva (2012) observou que, assim como esperado, o tratamento com calagem provocou o aumento no pH do solo e na capacidade de troca catiônica, e reduziu a zero as concentrações de Al^{3+} . Já em 2015, Mello (2019) coletou solos novamente para investigar se ainda havia efeitos residuais da adição de nutrientes sobre as propriedades químicas do solo, indicando que os efeitos persistiram, com maior disponibilidade de cátions trocáveis como Mg^{2+} e Ca^{2+} e menores concentrações de K^+ e de Al^{3+} . Na vegetação, Mello (2019) observou que a calagem favoreceu a invasão pela gramínea *M. minutiflora*, assim como nos tratamentos NP e P, e favoreceu a presença de outras gramíneas exóticas. Também foram documentadas

reduções na produção de flores e na taxa de visitação por polinizadores neste tratamento (Mello, 2019). Na vegetação arbóreo-arbustiva houve alteração do perfil metabolômico foliar de duas espécies lenhosas, aumento nas taxas de herbivoria em *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) e aumento no número de esporos de FMA associados à área de influência da raiz (Martins, 2019). Nas interações abaixo do solo (*bulk soil*) também foram descritas alterações no número total de esporos de FMA e no número de esporos por grupo taxonômico e funcional (Mello, 2019), mesmo após nove anos sem adição de calcário na área.

Embora os efeitos da fertilização sobre a vegetação e sobre processos que ocorrem acima do solo estejam bem relatados neste experimento, o entendimento de como as alterações na disponibilidade de nutrientes atuam e interagem com o componente abaixo do solo é ainda pouco compreendido. Com o aprimoramento das técnicas moleculares novos aspectos da diversidade e papel dos microrganismos em processos ecossistêmicos-chave podem agora ser melhor elucidados. Três anos após a última adição de nutrientes, Silva (2012), por exemplo, utilizou sequenciamento de alto desempenho através da técnica de pirosequenciamento do gene 16S rRNA para caracterizar a comunidade bacteriana nos solos coletados ao longo de 2009 na área do experimento. Nestes solos foram encontrados o total de 18 filos, entre os quais AD3¹, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia e WPS-2 tiveram frequência maior que 1% em pelo menos um dos tratamentos experimentais. Os filos dominantes foram Acidobacteria, seguido de um grupo de bactérias não classificadas e do filo Proteobacteria. Mudanças na abundância e presença/ausência de membros da comunidade bacteriana foram descritas tanto em resposta ao tratamento de adição de nutrientes quanto pela sazonalidade da precipitação no bioma.

O estudo de Silva (2012) contribuiu expressivamente para a caracterização da comunidade bacteriana nos solos dos tratamentos experimentais. No entanto, algumas outras perguntas a respeito dos efeitos de curto ou longo prazo da adição de nutrientes sobre essas comunidades e sua atividade, bem como sobre outros grupos microbianos como Archaea, ainda requerem respostas. Existe ainda uma evidente necessidade de se entender o papel ecológico desses microrganismos no funcionamento dos ecossistemas, já que são considerados os principais mediadores dos ciclos biogeoquímicos na natureza (Falkowski et al., 2008).

Para relacionar a diversidade e dinâmica temporal de ecossistemas com o funcionamento e processos ecossistêmicos, novas adições de nutrientes nos tratamentos descritos voltaram a ser realizadas em dezembro de 2017, após o início das primeiras chuvas, 11 anos após a última fertilização (Fig. 2). Outra questão emergente quando se considera os aspectos das mudanças globais associadas ao enriquecimento por nutrientes e alterações climáticas, é o entendimento de como a adição de nutrientes e a sazonalidade da precipitação em solos

¹ Recentemente o grupo AD3 foi reclassificado dentro da hierarquia taxonômica como uma classe dentro do filo Chloroflexi - SILVA database, release 132 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>) .

distróficos como os de Cerrado podem afetar etapas importantes na ciclagem biogeoquímica de nutrientes-chave para a manutenção dos processos ecossistêmicos no bioma. Em especial, o ciclo de nitrogênio é completamente mediado pela microbiota a partir da expressão de genes que codificam enzimas capazes de catalisar as inúmeras reações de oxidação e redução deste nutriente no solo (Bernhard, 2010; Canfield et al., 2010; Falkowski et al., 2008; Pajares and Bohannan, 2016).

Neste contexto, o presente estudo teve o objetivo de investigar as respostas das comunidades de bactérias e arqueias nos diferentes tratamentos de adição de nutrientes e caracterizar os efeitos da adição de nutrientes sobre a potencial atividade bacteriana no ciclo do nitrogênio nestes solos, considerando a sazonalidade da precipitação no bioma.

Revisão Bibliográfica

Microrganismos representam a maior porção da diversidade genética e metabólica no planeta, sendo amplamente reconhecidos como pilares da vida por seu papel essencial em processos biogeoquímicos que sustentam o equilíbrio dos ecossistemas (Elsas et al. 2019). Os solos são possivelmente os ecossistemas mais complexos e diversificados da biosfera, detendo elevada porção da megadiversidade de microrganismos existentes (Prosser, 2012). Estima-se que uma única grama de solo possa abrigar bilhões de células microbianas (Artursson, 2005) que interagem entre si, com outros organismos e com os elementos abióticos do próprio solo e da paisagem (Elsas et al. 2019). Estas células se organizam em comunidades cuja distribuição pode ser afetada por estes mesmos fatores. Apesar de sua abundância, o impacto de alterações nas propriedades químicas dos solos, nas espécies vegetais, nas condições microclimáticas e de precipitação sobre a diversidade de microrganismos é ainda pouco compreendido, especialmente em áreas não antropizadas.

A diversidade microbiana constitui o componente biológico da fertilidade do solo e está intrinsecamente relacionada aos seus atributos físicos e químicos. Juntos, estes três componentes (físico, químico e biológico) são importantes precursores da disponibilidade de nutrientes nos solos. Solos tropicais são, em sua maioria, naturalmente limitados por nutrientes, o que os faz quimicamente inférteis, embora sejam biologicamente diversos. No Cerrado, segundo maior bioma da América do Sul (MMA 1998) e uma das mais ricas e biodiversas savanas tropicais no mundo (Eiten 1972; Ribeiro e Walter 2008), a enorme diversidade de formações vegetais evoluiu sob forte influência da variação sazonal no balanço hídrico (Lima e Silva 2008; Silva et al. 2008) e sob baixa disponibilidade de nutrientes nos solos (Medina 1993; Reatto et al. 2008). A baixa disponibilidade de nutrientes como Ca, Mg, K, N e P é fortemente influenciada pelas características do solo que são tipicamente ácidos, álicos, argilosos e altamente intemperizados (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008). Enquanto a influência desses parâmetros é bem reconhecida na determinação da composição das comunidades vegetais (Medina 1993; Jacobson et al. 2011; Lannes et al. 2016), o conhecimento a respeito desses efeitos na microbiota do solo ainda é pobremente abordado.

Padrões gerais de distribuição da comunidade microbiana: o que podemos considerar para o Cerrado?

Encontrar e entender padrões de diversidade de Bacteria e Archaea na natureza representa uma tarefa extremamente difícil, considerando a elevada plasticidade fisiológica e diversidade desses grupos microbianos. Embora já saibamos que a dinâmica da comunidade microbiana pode ser altamente dependente de fatores microclimáticos, como temperatura e disponibilidade de água nos diferentes biomas (Supramaniam et al., 2016), outras variáveis tipicamente associadas à diversidade de plantas e animais (altitude, temperatura ambiente, etc.) nem sempre são aplicáveis em estudos de ecologia microbiana (Fierer and Jackson, 2006). Fierer e Jackson (2006)

estudaram os fatores que podem influenciar a biodiversidade bacteriana em escala continental ao longo da América do Norte e América do Sul. Diferentemente dos padrões que comumente direcionam a diversidade de plantas e animais, a riqueza e diversidade bacteriana neste estudo foram mais influenciadas pelo pH dos solos, sugerindo um controle primário das variáveis edáficas sobre a distribuição desse grupo microbiano (Fierer and Jackson, 2006). O pH parece ser um importante preditor também para o estabelecimento de Archaea nos solos, além do nitrogênio total, capacidade de troca catiônica e características físicas como o teor de argila nos solos (Lynn et al., 2017; Tripathi et al., 2015). Enquanto o pH mais próximo ao neutro é geralmente descrito como um facilitador para o estabelecimento de grupos bacterianos, Archaea pode ter vantagem competitiva em pH mais ácido e ambientes oligotróficos (Rughöft et al., 2016). Por outro lado, a própria composição da microbiota do solo já descrita no Cerrado aponta para a importância de se avaliar esse tipo de resposta em níveis taxonômicos e/ou filogenéticos mais específicos. Por exemplo, Acidobacteria é frequentemente encontrada com elevada abundância nos solos tipicamente ácidos das diferentes fitofisionomias que caracterizam o Cerrado (de Araujo et al., 2017; Rachid et al., 2013).

Neste sentido, esforços no entendimento de como a comunidade de bactérias e arqueias respondem a adição de nutrientes no solo é essencial para uma melhor compreensão dos fatores que controlam a abundância e determinam os aspectos ecológicos da atividade da microbiota no Cerrado.

Composição da comunidade microbiana em solos de Cerrado: o que sabemos?

Os grupos microbianos do solo podem ser acessados a partir de uma variedade de abordagens genéticas e/ou fenotípicas. No Cerrado, pesquisadores têm empregado diferentes métodos independentes de cultivo para descrever a composição da comunidade de bactérias, arqueias e fungos em solos das diferentes fitofisionomias que caracterizam o bioma. A partir da técnica de análise dos perfis de ácidos graxos (*phospholipid fatty acid analysis* - PLFA), Viana et al. (2011) compararam os efeitos da vegetação nativa e os efeitos da pastagem sobre a dinâmica das populações de bactérias e fungos na fração 0 - 5 cm do solo. Embora os autores não tenham identificado os grupos que compõem a comunidade, demonstraram que a biomassa microbiana é maior nas áreas nativas em relação à área de pastagem e que o período chuvoso favorece o aumento desta biomassa nas áreas nativas. Maior biomassa microbiana em áreas nativas comparadas a uma área com plantio de soja também foi encontrada por Bresolin et al. (2010).

A identificação dos principais filos microbianos que compõem as comunidades em solos de Cerrado tem sido realizada por meio do acesso ao material genético (DNA) destes organismos extraído diretamente das amostras de solo (Catão et al., 2014; Pereira de Castro et al., 2016; Rampelotto et al., 2013; Silva, 2012; Souza et al., 2016). Um dos primeiros estudos publicados empregando isolamento, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA para caracterização da comunidade bacteriana do solo de Cerrado apontou elevada abundância de grupos α -Proteobacteria em áreas com vegetação nativa e maior abundância de Actinobacteria em áreas

convertidas a pastagem (Quirino et al., 2009). Em um estudo subsequente, Araújo et al. (2012) combinaram diferentes técnicas de *fingerprinting* com pirosequenciamento do gene 16S rRNA para descrever a comunidade de bactérias do solo sob diferentes formações vegetais ainda preservadas no bioma. Os autores demonstraram que, de modo geral, a composição da comunidade microbiana dos solos de Cerrado é similar entre as fitofisionomias estudadas, mas com diferenças na riqueza e abundância dos grupos. Tais diferenças estão provavelmente associadas à cobertura vegetal e às propriedades químicas e físicas do solo nestas formações (Araujo et al., 2012).

Diferentes sistemas de uso da terra também são importantes fatores na composição e abundância das comunidades bacterianas do solo de Cerrado, podendo causar tanto perda de diversidade quanto mudanças na presença/ausência de determinados grupos de bactérias (Rampelotto et al., 2013). De acordo com Rampelotto et al. (2013) e Souza et al. (2016 b), solos de áreas nativas são dominados pela presença de Acidobacteria, enquanto em solos sob plantio direto ou plantio convencional predominam grupos pertencentes ao filo Proteobacteria. Em áreas experimentais com efeito residual da adição de nutrientes, maiores variações na abundância dos grupos bacterianos que compõem a microbiota do solo podem ser observadas especialmente dentro daqueles filos com menor frequência relativa (Silva, 2012).

Além das mudanças na cobertura e uso da terra, a sazonalidade da precipitação no Cerrado é outro importante fator na determinação da densidade total e na abundância dos microrganismos do solo (Silva, 2012; Viana et al., 2011). Em solos de diferentes fitofisionomias, a abundância relativa de determinados táxons bacterianos, tais como Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, diminui durante a estação chuvosa, enquanto a abundância relativa de Proteobacteria aumenta (Pereira de Castro et al., 2016). Tais alterações nas comunidades podem ser resultado das mudanças no pH, umidade gravimétrica e biomassa microbiana do solo em função da estação chuvosa (Bresolin et al., 2010).

De modo geral, os principais grupos bacterianos descritos para compor a microbiota do solo no Cerrado são Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria, entre outros com menor frequência relativa (Araujo et al., 2012; Catão et al., 2014; Pereira de Castro et al., 2016; Rampelotto et al., 2013; Silva, 2012; Souza et al., 2016). Acidobacteria é comumente descrito como o filo bacteriano dominante em solos de Cerrado de diferentes formações vegetais, geralmente seguido do filo Proteobacteria (Araujo et al., 2012; Catão et al., 2014; Catão et al., 2014; Silva, 2012). Os membros de Acidobacteria são grupos heterotróficos versáteis na utilização dos recursos disponíveis, amplamente distribuídos na maioria dos ecossistemas e são metabolicamente similares ao filo Proteobacteria (Kielak et al., 2016). Apesar da elevada abundância desses dois filos nos solos de diferentes regiões do mundo, a ecologia destes dois grupos ainda é pouco entendida. Sabe-se que Acidobacteria e Proteobacteria incluem membros com metabolismo altamente diverso que, entre muitas outras atividades, também tem papel importante na ciclagem de nitrogênio. Em Acidobacteria, por exemplo, já foram encontrados membros com potencial atividade para redução de nitrito e nitrato e também para a redução do nitrogênio

atmosférico a amônio (Kielak et al., 2016). Recentemente, um membro desse grupo (*Telmatobacter* sp. AB60) foi reportado com possível capacidade de redução assimilativa de nitrato, indicando uma provável rota metabólica de consumo de N por este microrganismo (Moura, 2019). Em Proteobacteria, organismos de vida livre e simbioses com plantas pertencentes às classes α -Proteobacteria e β -Proteobacteria, são conhecidos pelo seu papel na fixação biológica do nitrogênio (Boyd and Peters, 2013).

Archaea foi por muito tempo considerada um grupo dentro de Bacteria, devido às semelhanças na morfologia celular desses dois grupos de procariotos (Spang et al., 2017). Somente em 1977, Woese e colaboradores conseguiram distinguir Archaea em um terceiro domínio na história evolutiva (Woese et al., 1990). Com o avanço dos novos métodos moleculares, membros de Archaea que eram anteriormente pensados para habitar somente ambientes extremos, puderam ser identificados nos mais diferentes ambientes, incluindo os solos (Ochsenreiter et al., 2003; Oline et al., 2006). Assim como em Bacteria, a diversidade de Archaea também pode ser acessada através do gene 16S rRNA, mas estudos incluindo a descrição e ecologia dos membros desse domínio em solos de Cerrado ou mesmo em outros ambientes brasileiros são ainda mais escassos (Rodrigues et al., 2016). Uma das publicações pioneiras para o bioma, aponta o filo Thaumarchaeota como dominante em solos sob cobertura vegetal nativa (Catão et al., 2013). Considerando a escala temporal, independente da estação, este filo representa o grupo mais abundante dentro da comunidade de arqueias em solos de Cerrado sob vegetação nativa (Castro et al. 2016). Por outro lado, a sazonalidade da precipitação constitui um importante fator ambiental na determinação da abundância e presença de outros grupos pertencentes a Archaea, tais como Methanomicrobia, uma classe de organismos metanogênicos afiliados a Euryarchaeota, cuja abundância parece ser favorecida na estação chuvosa (Pereira de Castro et al., 2016).

Alguns grupos afiliados a Archaea também são descritos para mediar processos biogeoquímicos importantes. Arqueias podem atuar na fixação biológica de nitrogênio e são amplamente associadas ao processo de oxidação de amônio (nitrificação). Embora a taxa de nitrificação seja mínima em solos de Cerrado sob cobertura nativa (Nardoto and Bustamante, 2003), arqueias e bactérias oxidantes de amônio (AOA e AOB, respectivamente) foram encontradas em solos da formação Campo Sujo submetidos a um experimento em microcosmos, com maior abundância de transcritos do gene *amoA* pertencendo a AOA (Catão et al., 2017). Em uma publicação anterior, os mesmos autores indicam que a comunidade de oxidantes de amônio pode ser mais abundante em solos de Cerrado convertidos para a agricultura, provavelmente devido ao manejo e à maior disponibilidade de nitrogênio na forma de nitrato nessas áreas comparadas às áreas nativas (Catão et al., 2016).

O entendimento dos fatores que influenciam a composição e diversidade das comunidades microbianas no solo é atualmente crítico para prever potenciais consequências nas mudanças ambientais em escala local. Em especial, compreender a atividade da microbiota em processos como o ciclo do nitrogênio no Cerrado, altamente conservativo (Nardoto e Bustamante 2003), pode nos ajudar na preservação da diversidade acima e

abaixo do solo e nos fornecer novas perspectivas sobre como manter equilibradas as funções ecossistêmicas no bioma.

O ciclo do nitrogênio

Entre os processos biogeoquímicos essenciais para a sustentabilidade e equilíbrio dos ecossistemas, o ciclo global do nitrogênio (N) tem atraído pesquisadores do mundo inteiro, com fortes expectativas de estudo em relação a ecologia microbiana envolvida neste processo. Isto porque o nitrogênio molecular (N_2) presente na atmosfera, pode ser transformado por comunidades microbianas complexas que ainda são pouco descritas ou mesmo desconhecidas (Graham et al., 2011). Essas comunidades compreendem grupos de microrganismos que utilizam o N_2 e disponibilizam como produto do seu metabolismo, formas nitrogenadas intermediárias e reativas como amônio (NH_4^+) (Correa-Galeote et al., 2014; Wagner, 2011). Outros grupos microbianos, decompõem o nitrogênio orgânico (N_{org}) em NH_4^+ (Zhang et al., 2013). O NH_4^+ pode ser assimilado por outras populações microbianas passando por uma nova via metabólica para ser transformado e disponibilizado na forma de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) ou em espécies gasosas como óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) (Bernhard, 2010).

Claramente, a atuação da microbiota na disponibilização de nutrientes no solo é altamente relevante para o ciclo do N. O nitrogênio está entre os seis elementos básicos constituintes das macromoléculas biológicas (H, C, N, O, S e P) (Falkowski et al., 2008), mais importantes para a existência da vida no planeta, sendo o principal componente de proteínas e ácidos nucleicos (Canfield et al., 2010). No entanto, cerca de 78% desse elemento é encontrado na atmosfera terrestre em forma gasosa (dinitrogênio - N_2) contendo uma tripla ligação ($N \equiv N$) que não pode ser rompida diretamente pela maioria das formas de vida, e portanto, não é uma forma possível de ser assimilada por grande parte da biota (Bernhard, 2010; Wagner, 2011). Isso faz com que o nitrogênio seja um elemento regulador e limitante para a produtividade primária em ecossistemas aquáticos e terrestres (Vitousek and Howarth, 1991) e, portanto, amplamente relacionado à estabilidade funcional desses ecossistemas (Isobe and Ohte, 2014).

O N é um elemento altamente dinâmico na natureza, ocorrendo em várias formas químicas, com grande influência das condições de oxido-redução no solo. O ciclo biogeoquímico que envolve as transformações químicas deste elemento compreende um grande número de reações oxidativas e redutivas complexas que são catalisadas por uma ampla variedade de enzimas microbianas (Correa-Galeote et al., 2014). Com o avanço da biologia molecular, a ecologia e diversidade microbiana, bem como seu papel funcional em processos biogeoquímicos podem, aos poucos, ser melhor elucidados (Cardenas and Tiedje, 2008). Considerando a fundamental participação de grupos microbianos no ciclo do N, análises da estrutura e atividade dessas comunidades a partir de genes funcionais envolvidos no ciclo biogeoquímico deste elemento, podem contribuir para um melhor entendimento dessa função ecossistêmica nos diversos ambientes.

Nos solos de Cerrado, maior fração do N inorgânico no solo é encontrado sob a forma de NH_4^+ . As etapas do ciclo do N que ocorrem sob condições anaeróbicas contribuem muito pouco no balanço do nitrogênio. A nitrificação líquida em solos de Cerrado nativo, por exemplo, é muitas vezes indetectável (Nardoto and Bustamante, 2003) e as taxas emissões de gases como NO e N_2O são muito baixas (Fernandes Cruvinel et al., 2011; Pinto, 2002), sugerindo um ciclo mais conservativo do nitrogênio (Pinto 2002). Neste sentido, o processo mais importante do metabolismo do N em solos de Cerrado pode ser representado especialmente pela fixação biológica. No entanto, existem poucas informações sobre como a adição de nutrientes e a sazonalidade pode influenciar a atividade das comunidades microbianas envolvidas neste processo, o que pode ser estudado a partir do gene *nifH*.

Fixação biológica

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é a principal forma de entrada de N nos ecossistemas (Galloway et al., 2004; Vitousek et al., 2002). Em estudos da comunidade microbiana capaz de fixar o N_2 , o emprego de técnicas moleculares que permitem o acesso ao gene *nifH* vêm sendo largamente aplicadas (Gaby and Buckley, 2012, 2011; Pajares and Bohannan, 2016). O gene *nifH* codifica a subunidade ferro-proteína do complexo enzimático nitrogenase redutase² em Bacteria e Archaea (Zehr et al., 2003), cujo papel é catalisar as reações de redução do gás N_2 a NH_4^+ (Shridhar, 2012; Zehr et al., 2003). Esta reação é realizada sob elevada demanda energética devido à estabilidade da ligação tripla no N_2 (Vanderleyden et al., 2001). A partir deste processo as formas nitrogenadas reativas necessárias para a biossíntese de macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas são disponibilizadas para a biota. Como o gene *nifH* é amplamente distribuído entre Bactéria e Archaea com sequências conservadas nos dois domínios (Zehr et al., 2003) pode ser considerado um bom marcador biológico para inferir a diversidade e o papel ecológico da comunidade fixadora de N_2 (Gaby and Buckley, 2012). Além disso, solos podem conter grande diversidade de sequencias desse gene (Gaby and Buckley, 2011).

Os grupos de fixadores de N_2 conhecidos são coletivamente denominados como diazotróficos (Newton, 2007). São encontrados tanto em associação com raízes de plantas, formando nódulos de atividade de fixação, quanto podem ser encontrados sob a forma de vida livre, fixando o N_2 atmosférico de forma independente. Reed et al. (2011) definem a fixação biológica de vida livre como qualquer forma biológica de fixação que não compreende a estreita relação simbiótica entre plantas e microrganismos. Fazem parte da comunidade de

² A nitrogenase redutase é uma enzima composta por duas proteínas conservadas: uma dinitrogenase redutase ferro-proteína (Fe *protein*) codificada pelo gene *nifH* e uma dinitrogenase ferro-molibidênio (Fe-Mo *protein*) codificada por genes *nifDK* (Shridhar, 2012). O Fe e o Mo fazem parte do cofator enzimático ferro-molibênio (FeMo-co) e constitui o sítio onde ocorre a redução do N_2 . São conhecidas outras duas nitrogenases que não possuem Mo, mas vanádio (V) e Fe, ou apenas Fe em seus cofatores, sendo produzidas por determinados grupos de bactérias fixadoras quando o molibdênio não está disponível no ambiente (Madigan et al., 2016). Em Archaea, a nitrogenase é descrita para apresentar em seu sítio ativo de fixação apenas o Fe como cofator e são limitadas a poucas espécies produtoras de metano (Madigan et al. 2016).

diazotróficos aeróbicos de vida livre os gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Cyanobacteria*, *Alcaligenes*, entre outros. Entre os fixadores anaeróbicos de vida livre estão os gêneros *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Rhodobacter*, entre outros, e as arqueias *Methanosarcina*, *Methanococcus* e *Methanocaldococcus* (Madigan et al., 2016). Embora a contribuição para a fixação de N_2 por microrganismos de vida livre seja possivelmente menor que aquela realizada por microrganismos simbiotes (Cleveland et al., 1999), a atividade dos fixadores de vida livre pode estar sendo subestimada (Reed et al., 2010). O menor número de estudos envolvendo essa comunidade pode justificar a comum percepção de que a FBN por microrganismos de vida livre é menos representativa que aquela derivada da associação simbiótica (Reed et al., 2011).

Através do estudo do gene *nifH* como marcador molecular, pesquisadores tem caracterizado aspectos da diversidade e ecologia dos microrganismos fixadores de N_2 nos solos de diferentes regiões. Na Dakota do Sul, Dahal et al. (2017) investigaram a composição da comunidade microbiana de vida livre envolvida na FBN em solos áridos a partir dos genes *nifH* e 16S rRNA. Os autores encontraram grupos pertencentes aos filos bacterianos Actinomycetes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, descritos para apresentar potencial atividade no metabolismo do N. Também empregando o gene *nifH*, Berthrong et al. (2014) demonstraram o efeito negativo da fertilização química sobre a abundância e a diversidade da comunidade de bactérias fixadoras de N_2 em solos de três sistemas florestais temperados submetidos à fertilização nitrogenada e à elevadas concentrações de CO_2 .

Em relação à fertilização dos solos no Cerrado, além do problema inerente à lixiviação dos compostos nitrogenados adicionados (Oliveira-Filho and Lima, 2002), a adição de nutrientes também pode provocar alterações na diversidade microbiana e a redução da atividade biológica dos microrganismos fixadores de N_2 . Como a maioria das pesquisas relacionadas à diversidade e filogenia de microrganismos associados ao ciclo do N estão concentradas em regiões temperadas, pouco se conhece a respeito da ecologia de microrganismos do ciclo do N nas regiões tropicais e subtropicais (Pajares and Bohannan, 2016). As regiões tropicais são interessantes por apresentar uma dinâmica muito diferente daquela encontrada nos sistemas temperados, como precipitação sazonal relativamente alta, baixa flutuação de temperatura anual, alta diversidade de plantas e propriedades químicas peculiares no solo (Pajares and Bohannan, 2016). Em um estudo realizado em solos tropicais da Amazônia, por exemplo, o gene *nifH* foi utilizado como marcador molecular para identificar as respostas da comunidade de diazotróficos de vida livre ao desmatamento da floresta (Mirza et al., 2014). Os autores também identificaram grupos pertencentes a Proteobacteria e Firmicutes, além dos gêneros *Methanocella* e *Methanosphaerula*, afiliados a Archaea. Os solos de Cerrado são descritos para abrigar grande abundância destes filos, especialmente Proteobacteria (Pereira de Castro et al., 2016; Quirino et al., 2009; Souza et al., 2016), mas ainda não existem maiores inferências ecológicas testadas a respeito da atividade de fixação de N_2 desses grupos nos solos do bioma.

Neste aspecto, temos informações limitadas sobre como essa comunidade microbiana responde à adição de nutrientes minerais em curto e longo prazo e quais fatores regulam ou se associam à contribuição relativa da microbiota na ciclagem de N nos solos, especialmente em solos de Cerrado. Assim, detectar e prever como as comunidades de fixadores de N₂ no solo respondem à adição de nutrientes minerais e a sazonalidade é fundamental para progredirmos no entendimento a respeito do ciclo do N no Cerrado.

REFERÊNCIAS

- Aislabie, J., Deslippe, J.R., Dymond, J.R., 2013. Soil microbes and their contribution to soil services, in: Dymond, J.R. (Ed.), *Ecosystem Services in New Zealand - Conditions and Trends*. Mannaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, pp. 143–161.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L., 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 75, 129–137. doi:10.3354/ame01753
- Araujo, J.F., Castro, A.P. De, Costa, M.M.C., Togawa, R.C., Handelsman, J., Krüger, R.H., 2012. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-012-0057-3
- Belmok, A., Rodrigues-Oliveira, T., Lopes, F.A.C., Miranda, H.S., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2019. Long-term effects of periodical fires on archaeal communities from Brazilian Cerrado soils. *Archaea* 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/6957210
- Bernhard, A., 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3, 25.
- Bond, W.J., Woodward, F.I., Midgley, G.F., 2004. The global distribution of ecosystems in a world without fire. *New Phytologist* 165, 525–538. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01252.x
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2647–53.
- Boyd, E.S., Peters, J.W., 2013. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00201
- Bresolin, J.D., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., Silva, M.R.S.S., Perez, K.S., 2010. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 391–403.
- Brookshire, E.N.J., Wurzbarger, N., Currey, B., Menge, D.N.L., Oatham, M.P., Roberts, C., 2019. Symbiotic N fixation is sufficient to support net aboveground biomass accumulation in a humid tropical forest. *Scientific Reports* 9, 7571. doi:10.1038/s41598-019-43962-5
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Campanello, P.I., Villalobos-Vega, R., Bustamante, M., Miralles-Wilhelm, F., 2006. Nutrient availability constrains the hydraulic architecture and water relations of savannah trees. *Plant, Cell and Environment* 29, 2153–2167. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01591.x
- Bushnell, B., 2014. BBMap short read aligner. doi:DE-AC02-05CH11231
- Bustamante, M.M.C., Medina, E., Asner, G.P., Nardoto, G.B., Garcia-Montiel, D.C., 2006. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79, 209–237. doi:10.1007/s10533-006-9006-x
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11, 2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G., 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192–196.
- Cardenas, E., Tiedje, J.M., 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 544–549. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.010
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F.,

- Pedros-Alio, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4, 338–348. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x
- Catão, E., Castro, A.P., Barreto, C.C., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2013. Diversity of Archaea in Brazilian savanna soils. *Archives of Microbiology* 195, 507–512. doi:10.1007/s00203-013-0882-x
- Catão, E., Lopes, F., Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., 2014. Diversity and Function of Bacterial Assemblages in Savanna Vegetation Soils, in: Maheshwari, D. (Ed.), *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*. Springer, pp. 147–165. doi:10.1007/978-3-319-05936-5_6
- Catão, E.C.P., Lopes, F. a C., Araújo, J.F., de Castro, A.P., Barreto, C.C., Bustamante, M.M.C., Quirino, B.F., Krüger, R.H., 2014. Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. *International Journal of Microbiology* 2014, 156341. doi:10.1155/2014/156341
- Catão, E.C.P., Lopes, F.A.C., Rubini, M.R., Nardoto, G.B., Prosser, J.I., Krüger, R.H., 2016. Short-term impact of soybean management on ammonia oxidizers in a Brazilian savanna under restoration as revealed by coupling different techniques. *Biology and Fertility of Soils* 52, 401–412. doi:10.1007/s00374-015-1086-0
- Catão, E.C.P., Thion, C., Krüger, R.H., Prosser, J.I., 2017. Ammonia oxidisers in a non-nitrifying Brazilian savanna soil. *FEMS Microbiology Ecology* 93, 1–8. doi:10.1093/femsec/fix122
- Chapin, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., 2011. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*, 2nd ed. Springer, New York.
- Chen, C., Zhang, J., Lu, M., Qin, C., Chen, Y., Yang, L., Huang, Q., Wang, J., Shen, Z., Shen, Q., 2016. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* 52, 455–467. doi:10.1007/s00374-016-1089-5
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O., Perakis, S.S., Latty, E.F., Von Fischer, J.C., Elseroad, A., Wasson, M.F., 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13, 623–645. doi:10.1029/1999GB900014
- Correa-Galeote, D., Tortosa, G., Bedmar, E.J., 2014. Microbial Nitrogen Cycle: Determination of Microbial Functional Activities and Related N-compounds in Environmental Samples, in: Marco, D. (Ed.), *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications*. Caister Academic Press, Argentina, pp. 175–193.
- Cuevas-Reyes, P., De Oliveira-Ker, F.T., Fernandes, G.W., Bustamante, M., 2011. Abundance of gall-inducing insect species in sclerophyllous savanna: understanding the importance of soil fertility using an experimental approach. *Journal of Tropical Ecology* 27, 631–640. doi:10.1017/S0266467411000368
- Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., Brözel, V.S., 2017. Diversity of free-living nitrogen fixing Streptomyces in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological Research* 195, 31–39. doi:10.1016/j.micres.2016.11.004
- de Araujo, A.S.F., Bezerra, W.M., dos Santos, V.M., Rocha, S.M.B., Carvalho, N. da S., de Lyra, M. do C.C.P., Figueiredo, M. do V.B., de Almeida Lopes, Â.C., Melo, V.M.M., 2017. Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 110, 457–469. doi:10.1007/s10482-016-0815-1
- de Carvalho, T.S., Jesus, E. da C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M. de S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology* 97, 2760–2771. doi:10.1002/ecy.1513
- de Mello, T.R.B., Munhoz, C.B.R., Bustamante, M.M.C., 2014. Effects of nutrient additions on the diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado), in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Sheppard, L.J., Sverdrup, H., Haeuber, R., Hicks, W.K. (Eds.), *Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, pp. 147–154. doi:10.1007/978-94-007-7939-6_16
- Eiten, G., 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38, 201–341.
- Embrapa, C.N. de P. de S., 1997. *Manual de métodos de análise de solo*, 2nd ed. Embrapa-CNPQ. Documentos,1, Rio de Janeiro.
- Espíndola, S.P., Bobuřská, L., Ferreira, A. de S., 2018. Impact of nitrogen additions on soil microbial respiration and temperature sensitivity in native and agricultural ecosystems in the Brazilian Cerrado. *Journal of Thermal Biology* 75,

- 120–127. doi:10.1016/j.jtherbio.2018.06.005
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., 2008. Ameliorating Soil Acidity of Tropical Oxisols by Liming For Sustainable Crop Production. pp. 345–399. doi:10.1016/S0065-2113(08)00407-0
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The microbial engines that drive Earth’s biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
- Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 340–373.
- Fernandes Cruvinel, Ê.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., Zepp, R.G., 2011. Soil emissions of NO, N₂O and CO₂ from croplands in the savanna region of central Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 29–40. doi:10.1016/j.agee.2011.07.016
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 357. doi:10.1073/pnas.0507535103
- Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Rütting, T., 2019. Evolution of nitrogen cycling in regrowing Amazonian rainforest. *Scientific Reports* 9, 8538. doi:10.1038/s41598-019-43963-4
- Foster, Z.S.L., Sharpton, T.J., Grünwald, N.J., 2017. Metacoder: an R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology* 13, e1005404. doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2017. The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance. *Microbial Ecology* 74, 701–708. doi:10.1007/s00248-017-0968-0
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042149
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology* 13, 1790–1799. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02488.x
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Voesch, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- Garofalo, C.R., 2001. Efeitos do aumento da disponibilidade de nutrientes na dinâmica de nutrientes em plantas lenhosas e solo em uma área de Cerrado stricto sensu. Universidade de Brasília.
- González-Pedraza, A.F., Dezzeo, N., 2014. Effects of Land Use Change and Seasonality of Precipitation on Soil Nitrogen in a Dry Tropical Forest Area in the Western Llanos of Venezuela. *The Scientific World Journal* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/514204
- Graham, J.E., Wantland, N.B., Campbell, M., Klotz, M.G., 2011. Characterizing Bacterial Gene Expression in Nitrogen Cycle Metabolism with RT-qPCR 1 . Why Study Bacterial Transformation of Nitrogen is a key element of life and the competition for its acquisition, 1st ed, *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes Part B*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-386489-5.00014-2
- Gürtler, V., Stainisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16. doi:10.1099/13500872-142-1-3
- Han, L.-L., Wang, Q., Shen, J.-P., Di, H.J., Wang, J.-T., Wei, W.-X., Fang, Y.-T., Zhang, L.-M., He, J.-Z., 2019. Multiple factors drive the abundance and diversity of the diazotrophic community in typical farmland soils of China. *FEMS Microbiology Ecology* 95. doi:10.1093/femsec/fiz113
- Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20, 183–195. doi:10.1590/S1677-04202008000300003
- Hietz, P., Turner, B.L., Wanek, W., Richter, A., Nock, C.A., Wright, S.J., 2011. Long-Term Change in the Nitrogen Cycle of Tropical Forests. *Science* 334, 664–666. doi:10.1126/science.1211979
- Homeier, J., Báez, S., Hertel, D., Leuschner, C., 2017. Editorial: Tropical Forest Ecosystem Responses to Increasing Nutrient Availability. *Frontiers in Earth Science* 5. doi:10.3389/feart.2017.00027
- Huergo, L.F., Pedrosa, F.O., Muller-Santos, M., Chubatsu, L.S., Monteiro, R.A., Merrick, M., Souza, E.M., 2012. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. *Microbiology* 158, 176–

190. doi:10.1099/mic.0.049783-0
- Hunke, P., Mueller, E.N., Schröder, B., Zeilhofer, P., 2015. The Brazilian Cerrado : assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use 1180, 1154–1180. doi:10.1002/eco.1573
- Isobe, K., Ohte, N., 2014. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* 29, 4–16. doi:10.1264/jsme2.ME13159
- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., 2019. Effects of nutrient addition on polyphenol and nutrient concentrations in leaves of woody species of a savanna woodland in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 35, 288–296. doi:10.1017/S0266467419000257
- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., 2011. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution* 159, 2236–2242. doi:10.1016/j.envpol.2010.10.019
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.00744
- Kielak, A.M., Cretoiu, M.S., Semenov, A. V., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2013. Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 263–272. doi:10.1128/AEM.02546-12
- Klink, C. a., Machado, R.B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19, 707–713. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x
- Kozovits, A.R., Bustamante, M.M.C., Garofalo, C.R., Bucci, S., Franco, A.C., Goldstein, G., Meinzer, F.C., 2007. Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a neotropical savanna. *Functional Ecology* 21, 1034–1043. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01325.x
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil : Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.025
- Lammel, D.R., Barth, G., Ovaskainen, O., Cruz, L.M., Zanatta, J.A., Ryo, M., de Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2018. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. *Microbiome* 6, 106. doi:10.1186/s40168-018-0482-8
- Lannes, L.S., Bustamante, M.M.C., Edwards, P.J., Olde Venterink, H., 2016. Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. *Plant and Soil* 400, 231–243. doi:10.1007/s11104-015-2725-9
- Larson, C.A., Mirza, B., Rodrigues, J.L.M., Passy, S.I., 2018. Iron limitation effects on nitrogen-fixing organisms with possible implications for cyanobacterial blooms. *FEMS Microbiology Ecology* 94. doi:10.1093/femsec/fiy046
- Levy-Booth, D.J., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 11–25. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.021
- Lima, A.B., Cannavan, F. de S., Germano, M.G., Andreote, F.D., De, P.A.M., Franchini, J.C., Teixeira, W.G., Tsai, S.M., 2015. Effects of vegetation and seasonality on bacterial communities in Amazonian dark earth and adjacent soils. *African Journal of Microbiology Research* 9, 2119–2134. doi:10.5897/AJMR2015.7453
- Lima, J.E.F.W., Silva, E.M., 2008. Recursos hídricos do bioma Cerrado: importância e situação, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 90–106.
- Lin, Y., Ye, G., Liu, D., Ledgard, S., Luo, J., Fan, J., Yuan, J., Chen, Z., Ding, W., 2018. Long-term application of lime or pig manure rather than plant residues suppressed diazotroph abundance and diversity and altered community structure in an acidic Ultisol. *Soil Biology and Biochemistry* 123, 218–228. doi:10.1016/j.soilbio.2018.05.018
- Liu, D., Keiblinger, K.M., Leitner, S., Wegner, U., Zimmermann, M., Fuchs, S., Lassek, C., Riedel, K., Zechmeister-Boltenstern, S., 2019. Response of Microbial Communities and Their Metabolic Functions to Drying–Rewetting Stress in a Temperate Forest Soil. *Microorganisms* 7, 129. doi:10.3390/microorganisms7050129
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, W., Zhang, T., Chen, H., Mo, J., 2015. Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Scientific Reports* 5, 14378.

doi:10.1038/srep14378

- Lynn, T.M., Liu, Q., Hu, Y., Yuan, H., Wu, X., Khai, A.A., Wu, J., Ge, T., 2017. Influence of land use on bacterial and archaeal diversity and community structures in three natural ecosystems and one agricultural soil. *Archives of Microbiology* 199, 711–721. doi:10.1007/s00203-017-1347-4
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Maron, P.A., Mougél, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus - Biologies* 334, 403–411. doi:10.1016/j.crv.2010.12.003
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* 17, 10. doi:10.14806/ej.17.1.200
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Medina, E., 1993. Mineral nutrition: tropical savannas, in: Behnke, H.D., Lüttge, U., Esser, K., Kadereit, J.W., Runge, M. (Eds.), *Progress in Botany / Fortschritte Der Botanik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 237–253. doi:10.1007/978-3-642-78020-2_12
- Meier, M., 1991. Nitratbestimmung in boden-proden (N-min-methode), Labor Praxis. Berlin.
- Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., La Roche, J., Geider, R.J., 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* 429, 292–294. doi:10.1038/nature02550
- Mirza, B.S., Potisap, C., Nüsslein, K., Bohannan, B.J.M., Rodriguesa, J.L.M., 2014. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the amazon rainforest. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 281–288. doi:10.1128/AEM.02362-13
- Motta, P.E.F., Curi, N., Franzmeier, D.P., 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado, in: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical*. Columbia University Press, New York, pp. 13–33.
- Moura, K.S.P. de, 2019. Utilização de nitrato por *Telmatobacter* sp. AB60 Acidobacteria. Universidade Católica de Brasília.
- Myers, N., Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, R. a, Fonseca, Gustavo a B, Fonseca, G a B, Kent, J., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–8. doi:10.1038/35002501
- Nardoto, G.B., Bustamante, M.M. da C., 2003. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 955–962. doi:10.1590/S0100-204X2003000800008
- Newton, W.E., 2007. Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation, in: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, Willian E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–129.
- Norman, J.S., Friesen, M.L., 2017. Complex N acquisition by soil diazotrophs: how the ability to release exoenzymes affects N fixation by terrestrial free-living diazotrophs. *The ISME Journal* 11, 315–326. doi:10.1038/ismej.2016.127
- Nottingham, A.T., Hicks, L.C., Ccahuana, A.J.Q., Salinas, N., Bååth, E., Meir, P., 2018. Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 54, 219–228. doi:10.1007/s00374-017-1247-4
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* 5, 787–797. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00476.x
- Oline, D.K., Schmidt, S.K., Grant, M.C., 2006. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. *Microbial Ecology* 52, 480–490. doi:10.1007/s00248-006-9101-5
- Oliveira-Filho, E.C. de, Lima, J.E.F.W., 2002. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado (No. 56), Documentos. Planaltina, DF. doi:ISSN: 1517-5111
- Oliveira, R.S., Bezerra, L., Davidson, E.A., Pinto, F., Klink, C.A., Nepstad, D.C., Moreira, A., 2005. Deep root function in soil water dynamics in cerrado savannas of central Brazil. *Functional Ecology* 19, 574–581. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01003.x
- Pajares, S., Bohannan, B.J.M., 2016. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–20. doi:10.3389/fmicb.2016.01045

- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* 18, 1403–1414. doi:10.1111/1462-2920.13023
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494
- Pearse, F., 2011. The Cerrado: Brazil's Other Biodiverse Region Loses Ground [WWW Document]. Yale School of Forestry & Environmental Studies.
- Pereira de Castro, A., Sartori da Silva, M.R.S., Quirino, B.F., da Cunha Bustamante, M.M., Krüger, R.H., 2016. Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLOS ONE* 11, e0148785. doi:10.1371/journal.pone.0148785
- Pereira e Silva, M.C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2013. Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS ONE* 8, e74500. doi:10.1371/journal.pone.0074500
- Pinto, A. de S., 2002. Soil emissions of N₂O, NO, and CO₂ in Brazilian Savannas: Effects of vegetation type, seasonality, and prescribed fires. *Journal of Geophysical Research* 107, 8089. doi:10.1029/2001JD000342
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Monrozier, L.J., 2001. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2255–2262. doi:10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1641–1650. doi:10.1093/molbev/msp077
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35, 7188–7196. doi:10.1093/nar/gkm864
- Quirino, B.F., Pappas, G.J., Tagliaferro, A.C., Collevatti, R.G., Neto, E.L., da Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M.C., Krüger, R.H., 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research* 164, 59–70. doi:10.1016/j.micres.2006.12.001
- Rachid, C.T.C.C., Santos, A.L., Piccolo, M.C., Balieiro, F.C., Coutinho, H.L.C., Peixoto, R.S., Tiedje, J.M., Rosado, A.S., 2013. Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE* 8, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0059342
- Rampelotto, P.H., Ferreira, A. de S., Barboza, A.D.M., Roesch, L.F.W., 2013. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. *Microbial Ecology* 66, 593–607. doi:10.1007/s00248-013-0235-y
- Reatto, A., Correia, J.R., Spera, S.T., Martins, E.S., 2008. Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos, in: Sano, S.M., Almeida, S.P. de, Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 108–149.
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R., 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42, 489–512. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034
- Reed, S.C., Townsend, A.R., Cleveland, C.C., Nemergut, D.R., 2010. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia* 164, 521–531. doi:10.1007/s00442-010-1649-6
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 2008. As Principais fitofisionomias do bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 152–212.
- Rodrigues, T., Belmok, A., Catão, E., Kyaw, C.M., 2016. Archaea in Natural and Impacted Brazilian Environments. *Archaea* 2016, 1–14. doi:10.1155/2016/1259608
- Rosch, C., Mergel, A., Bothe, H., 2002. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3818–3829. doi:10.1128/AEM.68.8.3818-3829.2002
- Rughöft, S., Herrmann, M., Lazar, C.S., Cesarz, S., Levick, S.R., Trumbore, S.E., Küsel, K., 2016. Community composition and abundance of bacterial, archaeal and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.01638
- Santos, H.G. dos, Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C. dos, Oliveira, V.A. de, Oliveira, J.B. de, COELHO, M.R., Lumberras, J.F.,

- Cunha, T.J.F., 2006. Sistema brasileiro de classificação de solos, 2nd ed. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Sarmiento, G., Goldstein, G., Meinzer, F., 1985. ADAPTIVE STRATEGIES OF WOODY SPECIES IN NEOTROPICAL SAVANNAS. *Biological Reviews* 60, 315–355. doi:10.1111/j.1469-185X.1985.tb00420.x
- Schimel, J.P., 2018. Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49, 409–432. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062614
- Scholz, F.G., Bucci, S.J., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Miralles-Wilhelm, F., 2007. Removal of nutrient limitations by long-term fertilization decreases nocturnal water loss in savanna trees. *Tree Physiology* 27, 551–559. doi:10.1093/treephys/27.4.551
- Sequerra, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A., Moiroud, A., 1997. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycological Research* 101, 465–472. doi:10.1017/S0953756296002857
- Shridhar, B.S., 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiology Research* 3, 46–52. doi:10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103
- Silva, F.A.M., Assad, E.D., Evangelista, B.A., 2008. Caracterização Climática do Bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 70–88.
- Silva, M.R.S.S., 2012. Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas. Universidade de Brasília.
- Silva, M.R.S.S., Pereira de Castro, A., Krüger, R.H., Bustamante, M., 2019. Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management. *Acta Oecologica* 100, 103463. doi:10.1016/j.actao.2019.103463
- Simpson Junior, P.L.S., 2002. Crescimento e fenologia foliar de espécies lenhosas de uma área de cerrado sensu stricto submetida a fertilização. Universidade de Brasília.
- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L., Tiemann, L.K., 2019. To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 85. doi:10.1128/AEM.02546-18
- Souza, R.C., Mendes, I.C., Reis-Junior, F.B., Carvalho, F.M., Nogueira, M.A., Vasconcelos, A.T.R., Vicente, V.A., Hungria, M., 2016. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: how fragile is the Brazilian Cerrado? *BMC Microbiology* 16, 42. doi:10.1186/s12866-016-0657-z
- Spang, A., Caceres, E.F., Ettema, T.J.G., 2017. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 11, 357. doi:10.1126/science.aaf3883
- Sridevi, G., Minocha, R., Turlapati, S.A., Goldfarb, K.C., Brodie, E.L., Tisa, L.S., Minocha, S.C., 2012. Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 728–740. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01258.x
- Ssekagiri, A., Sloan, W.T., Ijaz, U.Z., 2017. microbiomeSeq: an R package for analysis of microbial communities in an environmental context, in: ISCB Africa ASBCB Conference on Bioinformatics. International Society for Computational Biology, Entebbe, Uganda, p. B-064. doi:10.13140/RG.2.2.17108.71047
- Staver, A.C., 2017. Prediction and scale in savanna ecosystems. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.14829
- Stein, L.Y., Klotz, M.G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26, R94–R98. doi:10.1016/j.cub.2015.12.021
- Supramaniam, Y., Chong, C.W., Silvaraj, S., Tan, I.K.P., 2016. Effect of short term variation in temperature and water content on the bacterial community in a tropical soil. *Applied Soil Ecology* 107, 279–289. doi:10.1016/j.apsoil.2016.07.003
- Swift, M.J., Andren, O., Brussaard, L., Briones, M., Couteaux, M.-M., Ekschmitt, K., Kjoller, A., Loiseau, P., Smith, P., 1998. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Global Change Biology* 4, 729–743. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00207.x
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews* 599–623. doi:10.1093/femsre/fux039
- Thompson, L.R., Sanders, J.G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K.J., Prill, R.J., Tripathi, A., Gibbons, S.M., Ackermann, G., Navas-Molina, J.A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J.T., Mirarab,

- S., Zech Xu, Z., Jiang, L., Haroon, M.F., Kanbar, J., Zhu, Q., Jin Song, S., Kosciolk, T., Bokulich, N.A., Lefler, J., Brislawn, C.J., Humphrey, G., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J.A., Clauset, A., Stevens, R.L., Shade, A., Pollard, K.S., Goodwin, K.D., Jansson, J.K., Gilbert, J.A., Knight, R., 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457–463. doi:10.1038/nature24621
- Tripathi, B.M., Kim, M., Lai-Hoe, A., Shukor, N.A.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2013. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 86, 303–311. doi:10.1111/1574-6941.12163
- Tripathi, B.M., Kim, M., Tateno, R., Kim, W., Wang, J., Lai-Hoe, A., Ab. Shukor, N.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2015. Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biology and Biochemistry* 88, 1–8. doi:10.1016/j.soilbio.2015.05.004
- UNESCO, 2003. Subsídios ao zoneamento da APA Gama-Cabeça de Veado e Reserva da Biosfera do Cerrado : caracterização e conflitos socioambientais. Unesco, Brasil, MAB, Reserva da Biosfera, Brasília.
- van der Waal, C., de Kroon, H., de Boer, W.F., Heitkönig, I.M.A., Skidmore, A.K., de Knecht, H.J., van Langevelde, F., van Wieren, S.E., Grant, R.C., Page, B.R., Slotow, R., Kohi, E.M., Mwakiwa, E., Prins, H.H.T., 2009. Water and nutrients alter herbaceous competitive effects on tree seedlings in a semi-arid savanna. *Journal of Ecology* 97, 430–439. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01498.x
- Van Langenhove, L., Depaepe, T., Vicca, S., van den Berge, J., Stahl, C., Courtois, E., Weedon, J., Urbina, I., Grau, O., Asensio, D., Peñuelas, J., Boeckx, P., Richter, A., Van Der Straeten, D., Janssens, I.A., 2019. Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-019-04012-1
- Vanderleyden, J., Van Dommelen, A., Michiels, J., 2001. Fix Genes, in: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 707–709. doi:10.1006/rwgn.2001.1637
- Viana, L.T., Bustamante, M.M.D.C., Molina, M., Pinto, A.D.S., Kisselle, K., Zepp, R., Burke, R. a., 2011. Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. *Pesq. Agropec. Bras.* 46, 1665–1672.
- Vitousek, P., Howarth, R., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13. doi:10.1007/BF00002772
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I., 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57, 1–45.
- Wagner, S.C., 2011. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3, 15.
- Wang, Y., Ji, H., Gao, C., 2016. Differential responses of soil bacterial taxa to long-term P, N, and organic manure application. *Journal of Soils and Sediments* 16, 1046–1058. doi:10.1007/s11368-015-1320-2
- Wieczorek, A.S., Schmidt, O., Chatzinotas, A., von Bergen, M., Gorissen, A., Kolb, S., 2019. Ecological Functions of Agricultural Soil Bacteria and Microeukaryotes in Chitin Degradation: A Case Study. *Frontiers in Microbiology* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01293
- Wilhelm, R.C., Singh, R., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2019. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *The ISME Journal* 13, 413–429. doi:10.1038/s41396-018-0279-6
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wood, S.A., McGuire, K., Hickman, J.E., 2016. Microbial Communities and Processes under Climate and Land-use Change in the Tropics, in: Marxsen, J. (Ed.), *Climate Change and Microbial Ecology: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 214.
- Wu, R., Cheng, X., Zhou, W., Han, H., 2019. Microbial regulation of soil carbon properties under nitrogen addition and plant inputs removal. *PeerJ* 7, e7343. doi:10.7717/peerj.7343
- Wu, Y., Zeng, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Lin, X., 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in

- agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports* 7, 40093.
doi:10.1038/srep40093
- Xue, D., Huang, X., Yao, H., Huang, C., 2010. Effect of lime application on microbial community in acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1253–1260.
doi:10.1016/S1001-0742(09)60246-1
- Xun, W., Li, W., Huang, T., Ren, Y., Xiong, W., Miao, Y., Ran, W., Li, D., Shen, Q., Zhang, R., 2018. Long-term agronomic practices alter the composition of asymbiotic diazotrophic bacterial community and their nitrogen fixation genes in an acidic red soil. *Biology and Fertility of Soils* 54, 329–339. doi:10.1007/s00374-018-1264-y
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., Engel, A.S., 2016. The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implication for Soil Acidification. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01955
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., Steward, G.F., 2003. Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial community structure : a cross-system comparison 5, 539–554.
- Zhang, X., Liu, W., Schloter, M., Zhang, G., Chen, Q., Huang, J., Li, L., Elser, J.J., Han, X., 2013. Response of the Abundance of Key Soil Microbial Nitrogen-Cycling Genes to Multi-Factorial Global Changes. *PLoS ONE* 8, 2–11.
doi:10.1371/journal.pone.0076500

Hipóteses

- i. A adição de nutrientes no solo reduz a riqueza e diversidade das comunidades microbianas.
 - a. *Bactérias: embora o aumento da biomassa microbiana seja favorecido com o aumento na disponibilidade de nutrientes, grupos dominantes aumentam sua abundância relativa em relação aos grupos menos abundantes, reduzindo de modo geral a riqueza dos táxons.*
 - b. *Arqueias: são descritas para serem mais adaptadas à exploração de nichos menos energéticos e ambientes mais oligotróficos. Desse modo, a adição de nutrientes reduz também a riqueza desses grupos.*

- ii. A alteração no pH por meio da calagem modifica a composição da comunidade microbiana, implicando alterações sobre as funções ecossistêmicas mediadas por ela.
 - a. *O pH representa um importante fator para a distribuição e composição da comunidade microbiana nos diversos ecossistemas. Mudanças no pH tipicamente ácido dos solos de Cerrado podem promover a alteração da comunidade microbiana nativa e conseqüentemente, acarretar alterações das funções ecossistêmicas mediadas por grupos de microrganismos que foram substituídos, reduzidos ou enriquecidos através dos efeitos da calagem.*

- iii. A abundância dos genes *nifH* dos grupos microbianos de vida livre associados à fixação biológica do nitrogênio é reduzida pela adição de nitrogênio, sendo que o efeito será mais acentuado quando a adição é conjunta com fósforo. Adicionalmente, o aumento do pH do solo resulta também em uma redução da abundância dos genes *nifH*.
 - a. *Em particular, o aumento da disponibilidade de nitrogênio mineral pode reduzir as taxas de fixação biológica por microrganismos de vida livre fixadores de nitrogênio avaliada pela menor abundância e atividade do gene *nifH*. Tal efeito será mais evidente quando há suplementação conjunta de P (tratamento NP) uma vez que a redução da limitação por fósforo favorece a assimilação de nitrogênio. O aumento do pH reduz a atividade de fixação biológica de N em função da pressão seletiva exercida por condições de solo ácido sobre a comunidade de organismos fixadores.*

Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar os efeitos de longo prazo da adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo, nitrogênio em conjunto com o fósforo) e da calagem em solos de Cerrado sentido restrito, sobre a composição, e diversidade (abundância e riqueza) da comunidade microbiana, bem como suas potenciais implicações na distribuição de genes funcionais do metabolismo do nitrogênio (*nifH*), considerando a sazonalidade da precipitação no bioma.

Objetivos Específicos

- i. Caracterizar as alterações na composição, abundância e diversidade da comunidade microbiana em solos de Cerrado submetidos a diferentes tratamentos de adição de nutrientes nas estações chuvosa e seca.
- ii. Descrever e relacionar as propriedades químicas dos solos capazes de regular a abundância das comunidades microbianas do solo.
- iii. Investigar os efeitos da adição de nutrientes e da sazonalidade sobre o potencial da comunidade de bactérias de vida livre para fixação biológica de nitrogênio.

Capítulo 1 – Efeitos de longo prazo da adição de nutrientes sobre a diversidade da microbiota associada ao solo em uma área nativa do Cerrado

RESUMO

Solos do cerrado são geralmente intemperizados, profundos, bem drenados, ácidos, com altos níveis de alumínio e pobres em nutrientes. Essas propriedades poderiam torná-lo muito restritivo à maioria das formas de vida. No entanto, estes solos podem abrigar alta diversidade de microrganismos ainda pouco descritos, adaptados à essas condições. Para caracterizar as respostas da microbiota do solo às alterações na disponibilidade de nutrientes, as comunidades de bactérias e arqueias foram estudadas em um experimento de longo prazo de adição de nutrientes localizado na Reserva Ecológica do IBGE em Brasília, Brasil. O delineamento experimental foi composto por cinco tratamentos, sendo **1)** Controle: sem adição de nutrientes; **2)** Ca: tratamento com calagem; **3)** N: adição de nitrogênio; **4)** P: adição de fósforo e **5)** NP: adição de nitrogênio e fósforo em conjunto. Cada tratamento consiste em quatro parcelas de 15x15 m distribuídas aleatoriamente. A sazonalidade acentuada no bioma também foi considerada nas análises. As comunidades microbianas do solo (0 – 10 cm) foram acessadas através do seqüenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq. Foram encontrados 17 e cinco filos representativos dos domínios Bacteria e Archaea, respectivamente. A comunidade microbiana foi dominada por Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria e pelos filos pertencentes à Archaea Thaumarchaeota e Euryarchaeota. Estimadores ecológicos de diversidade indicaram um aumento na diversidade bacteriana nos solos sob calagem nas estações chuvosa e seca, enquanto a diversidade de Archaea foi maior nos tratamentos N, NP e P. A riqueza e a diversidade bacteriana foram maiores durante a estação seca nas parcelas com adição de N e calagem. A análise de β -diversidade com base na distância ponderada UniFrac mostrou diferenças na composição microbiana associada ao tratamento Ca e nos demais tratamentos em menor grau, como em P. Essas diferenças foram relacionadas principalmente ao aumento do pH e à presença de vegetação exótica no tratamento Ca, enquanto no tratamento com adição de P, a diferenciação foi mais associada às maiores concentrações de amônio. A diversidade taxonômica também foi acessada e pode-se observar respostas diferentes de comunidades microbianas dentro da mesma classe ou ordem. O conjunto de resultados gerado sugere que o microbioma do solo difere amplamente em sua vulnerabilidade às alterações nas propriedades do solo, sendo o pH o principal vetor das mudanças na composição da comunidade microbiana. Os resultados deste estudo geraram informações minuciosas sobre as mudanças na composição microbiana associada a solos alterados pela adição de nutrientes a longo prazo no cerrado e poderiam apoiar estudos futuros sobre ecologia microbiana em solos nativos e tropicais alterados.

Palavras-chave: diversidade microbiana, sazonalidade, ecossistemas tropicais, bioma Cerrado.

ABSTRACT

Cerrado soils are usually weathered, deep, well-drained, acidic, and nutrient-poor with high levels of aluminum. These chemical properties could make them very restrictive to most of the life forms. Nevertheless, these soils can harbor a high diversity of microorganisms adapted to those conditions, which remain poorly described. To characterize the microbial responses to nutrient limitation removal, we studied bacterial and archaeal communities from a long-term nutrient addition experimental area located at Reserva Ecológica do IBGE in Brasília, Brazil. The experiment design consisted of five treatments, as follows 1) Control: without nutrient addition; 2) Ca: liming treatment; 3) N: nitrogen addition; 4) P: phosphorous addition and 5) NP: nitrogen plus phosphorus addition. Each treatment consists of four 15x15 m plots randomly distributed. The marked seasonality in the biome was also considered in our analyses. The microbial communities from topsoil (0-10 cm) was accessed through 16S rRNA genes sequencing on the Illumina MiSeq platform. Were found 17 and five representative bacterial and archaeal groups across the samples, respectively. The microbial community was dominated by Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, and by the archaeal phyla Thaumarchaeota and Euryarchaeota. Ecological estimators of diversity indicated an increase in bacterial diversity on liming soils in both rainy and dry seasons while archaeal diversity was higher in the N, NP, and P treatments. The bacterial richness and diversity were higher during the dry season in N and liming plots. Analysis of β -diversity based on weighted UniFrac distances showed differences in microbial composition associated with liming and in the other treatments, such as P, but in a minor degree. These differences were mainly related to increased pH and the presence of exotic vegetation in liming, while in P the differentiation was more associated with higher ammonium concentrations. Also, the taxonomic diversity was accessed and was observed dissimilar responses of microbial communities inside the same class or order. The set of results suggests that soil microbiome differs widely in their vulnerability to changes in soil parameters. Our findings also indicate pH as the main driver of shifts in the microbial assemblage. The results of this study generated minacious information about changes in microbial composition associated with altered soils by long-term nutrient addition in cerrado and it could support futures studies on microbial ecology on native and altered tropical soils.

Keywords: Microbial diversity, seasonality, tropical ecosystems, Cerrado biome.

INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana do solo e seu papel funcional nos processos ecossistêmicos são questões que vêm sendo largamente debatidas pela comunidade científica no mundo inteiro, dada a atual preocupação com uso da terra e sua estreita relação com as mudanças ambientais globais (Wood et al., 2016). O solo, maior compartimento biogeoquímico dos ecossistemas terrestres, atua como um representativo reservatório da diversidade biológica e aprovisiona importantes serviços ecossistêmicos para a humanidade (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015; Swift et al., 1998). As principais funções ecossistêmicas do solo, como o ciclo do nitrogênio (N) por exemplo, são mediadas especialmente por comunidades microbianas presentes e ativas nesse compartimento, as quais integram um dos mais relevantes componentes para manutenção, equilíbrio e sustentabilidade da vida no planeta (Maron et al., 2011). Cada tipo de solo constitui um sistema extremamente complexo, resultado da combinação entre a geologia parental, tempo geológico, histórico de regime e uso da terra além da estrutura topográfica e atividade da biota (Aislabie et al., 2013; Tecon and Or, 2017). No Cerrado, savana neotropical caracterizada por um gradiente de fitofisionomias com a maior riqueza biológica do mundo (Myers et al., 2000; Pearse, 2011), predominam solos antigos, intemperizados, argilosos, tipicamente ácidos, profundos, bem drenados, com baixo teor de nutrientes e altos níveis de alumínio (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008; Ribeiro and Walter, 2008). Estes solos são classificados como Latossolos pelo Sistema Brasileiro de Classificação do Solo, apresentando coloração vermelha ou laranja devido à presença de óxidos de ferro (Santos et al., 2018). Todas estas características associadas ao clima fortemente sazonal no Cerrado (Silva et al., 2008; Alvares et al., 2013) remetem ao “paradoxo” da elevada biodiversidade abrigada acima e abaixo do solo e demandam atenção para uma abordagem mais integrada no entendimento dos processos ecológicos mediados pelas comunidades microbianas desse compartimento biogeoquímico tão importante em um bioma fortemente ameaçado em termos de perda de diversidade biológica (Hunke et al., 2015; Klink and Machado, 2005; Myers et al., 2000).

Considerando a rápida perda de *habitats* no Cerrado, muita diversidade microbiana abaixo do solo já pode ter sido perdida antes mesmo de ter sido conhecida ou caracterizada. Essa comunidade é representada por diferentes grupos de bactérias e outros organismos amplamente distribuídos pela natureza, que apresentam elevada plasticidade e diversidade fisiológica (Madigan et al., 2016). No solo, estes microrganismos podem desenvolver complexas interações com os demais organismos vivos e com o meio e, geralmente, sua abundância, diversidade e atividade metabólica são potencialmente influenciadas por fatores como disponibilidade de água e nutrientes, pH, temperatura, entre outros (Silva, 2012; Supramaniam et al., 2016; Tripathi et al., 2015). No Cerrado, dois importantes componentes determinantes de alguns desses fatores são a sazonalidade da precipitação (Silva et al., 2008) e as características do solo anteriormente descritas (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008).

Com implicações diretas na disponibilidade de água, a precipitação pode representar um forte preditor da composição e abundância da comunidade microbiana (Bresolin et al., 2010). Mesmo em solos de mata de galeria que apresentam menor estresse hídrico ao longo do ano, a entrada de água através da precipitação aparece como importante indicador das diferenças na composição das comunidades microbianas entre as estações seca e chuvosa (Lira 2012; Pereira de Castro et al. 2016). Além disso, as comunidades microbianas do solo podem ser influenciadas de forma indireta pela variação sazonal, já que os eventos de chuva podem favorecer também o aumento da biomassa e da atividade microbiana, além de alterar parâmetros como o pH do solo (Nardoto and Bustamante 2003; Bresolin et al. 2010).

A adição de nutrientes implica em alterações ainda mais complexas na dinâmica dos diferentes grupos que compõem a comunidade microbiana dos solos (Chen et al., 2016). Solos nutricionalmente limitados podem afetar processos microbianos como a decomposição e a respiração. De modo geral, para o Cerrado tem sido observado que o aumento na disponibilidade de nutrientes podem aumentar a biomassa microbiana do solo em áreas não antropizadas (Garofalo, 2001; Kozovits et al., 2007) e provocar alterações na composição e dominância de grupos de bactérias em solos sob sistema de preparo com plantio direto (Souza et al., 2016). Em um estudo prévio da comunidade microbiana em solos experimentalmente fertilizados durante oito anos consecutivos em uma área de Cerrado típico, Silva (2012) indicou grandes variações na abundância de grupos bacterianos com menor frequência relativa.

Apesar dos crescentes esforços na caracterização da microbiota do solo do Cerrado, o entendimento de como as mudanças nas características ambientais atuam sobre o componente abaixo do solo é ainda escasso. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os efeitos de longo prazo e interativos da adição de nutrientes e da sazonalidade da precipitação sobre a diversidade da microbiota associada ao solo e descrever como grupos específicos respondem às alterações nas propriedades químicas desse compartimento. Em particular, esse conhecimento de base é atualmente crítico para que possamos progredir no campo da ecologia microbiana e estabelecer medidas sustentáveis de preservação da biodiversidade dos solos no Cerrado, especialmente frente ao atual cenário do impacto das atividades antrópicas no solo e suas relações com as mudanças no clima global.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Este estudo foi conduzido em uma área experimental, localizada dentro da Reserva Ecológica do Roncador (RECOR, Fig. S1) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (15°56'S, 47°53'W,). A RECOR está localizada a 35 km ao sul do centro de Brasília, Distrito Federal, km 0 da BR 251, em uma altitude média de 1.100 m. Esta reserva, juntamente com a Estação Ecológica do Jardim Botânico e a Fazenda Água Limpa (pertencente à Universidade de Brasília - UnB), compõem a Área de Proteção Ambiental (APA) Gama Cabeça de

Veado, criada como Unidade de Conservação pelo Decreto distrital nº 9.471 de 21/04/1986, sob administração da Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SEMARH) em estreita articulação com a UnB, IBGE, CAESB e IBAMA (UNESCO, 2003).

A fitofisionomia da área experimental na RECOR caracteriza-se como cerrado sentido restrito (mais especificamente cerrado típico) apresentando estrato herbáceo contínuo (de Mello et al., 2014) associado a um estrato arbustivo-arbóreo (Jacobson et al., 2011). O solo, na região é do tipo Latossolo Vermelho, profundo, antigo, argiloso, ácido, com altos níveis de alumínio e baixa capacidade de troca catiônica (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008; Ribeiro and Walter, 2008; Santos et al., 2018). O clima é caracterizado como AW de acordo com a classificação de Köppen, com uma estação seca e fria entre maio a setembro e outra estação chuvosa e quente entre outubro a abril, quando ocorre cerca de 90% da precipitação anual, cuja média varia entre 1.100 e 1.700 mm (Silva et al., 2008; Alvares et al., 2013). Dados de precipitação acumulada mensal durante o período de estudo (2017 e 2018) foram obtidos da estação climatológica da RECOR-IBGE e são apresentados na Fig. 1.

O experimento de adição de nutrientes foi inicialmente estabelecido em 1998 e consiste em cinco tratamentos diferenciados de adição de nutrientes (ou fertilização): **1) C**: tratamento controle, sem adição de nutrientes; **2) Ca**: calagem; **3) N**: adição de nitrogênio; **4) NP**: adição de nitrogênio e fósforo combinados, e **5) P**: adição de fósforo. Os tratamentos experimentais estão distribuídos aleatoriamente. Cada tratamento está replicado quatro vezes, totalizando 20 parcelas com 15x15 m, separadas por uma distância mínima de 10 m. Cada parcela está subdividida em nove unidades de 5x5 m.

Para reduzir as perdas de nutrientes pelo sistema, os fertilizantes foram aplicados bianualmente, no início e no final da estação chuvosa, entre 1998 e 2006, com exceção da calagem, que foi realizada uma vez ao ano (Garofalo, 2001; Jacobson et al., 2011). Em dezembro de 2017, as adições de nutrientes foram retomadas na área, rompendo o período de 11 anos sem adições. Uma segunda aplicação de nutrientes foi realizada também em abril de 2018. No tratamento Ca foi realizada somente uma nova adição de calcário dolomítico, dado que os valores de pH do solo mostravam um forte efeito residual das adições anteriores a 2006. Todas as adições foram feitas a lanço, sobre a serapilheira e em quantidades iguais nas parcelas e em uma área envolvente com 1 m de largura. As formas químicas dos nutrientes adicionados são descritas na Tabela 1.

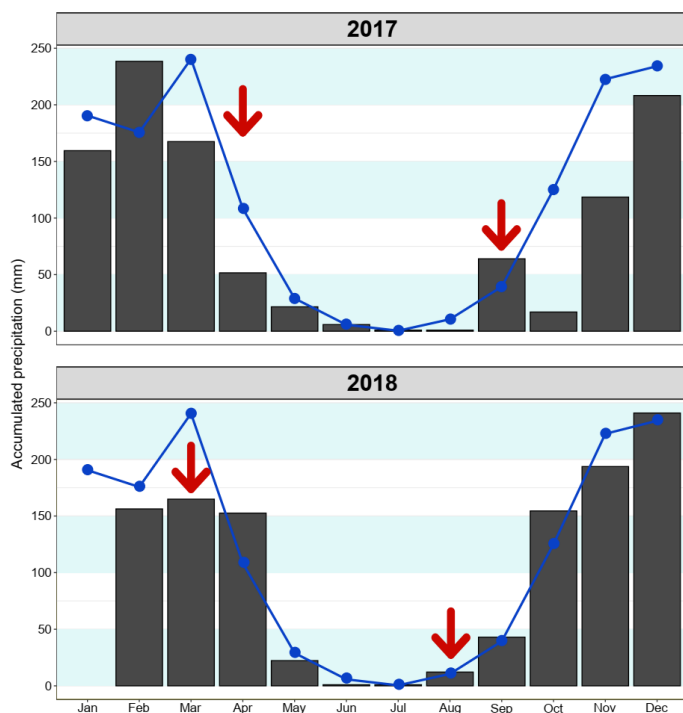


Fig. 1 Distribuição da precipitação mensal acumulada (mm) entre 2017 e 2018. Dados da estação climatológica da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Dados de janeiro de 2018 não coletados. As setas indicam os meses das coletas no presente estudo.

Tabela 1 Descrição dos tratamentos experimentais de adição de nutrientes da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil, com as respectivas quantidades aplicadas nos solos.

| Tratamento | | Forma química | | Quantidade (kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹) |
|------------|---|--|---|--|
| N | Adição de nitrogênio | Sulfato de amônio | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 |
| P | Adição de fósforo | superfosfato simples 20% | Ca(H ₂ PO ₄) ₂ + CaSO ₄ .2H ₂ O | 100 |
| NP | Adição concomitante de nitrogênio e fósforo | Sulfato de amônio + superfosfato simples 20% | (NH ₄) ₂ SO ₄ + Ca(H ₂ PO ₄) ₂ + CaSO ₄ .2H ₂ O | 200 |
| Ca | Adição de cálcio | 60% calcário dolomítico + 40% gesso agrícola | CaO+MgO + CaSO ₄ .2H ₂ O | 4.000 |
| C | Controle, sem adição de nutrientes | - | - | - |

Coletas

Amostras de solo (fração 0 - 10 cm de profundidade) foram coletadas para incluir neste estudo o período anterior e pós retomada das adições de nutrientes. Os solos foram coletados com o auxílio de um trado, nos meses de abril e setembro de 2017 e nos meses de março e agosto de 2018, abrangendo as estações chuvosa e seca de cada ano, respectivamente. O ano 2017 representa o período correspondente ao intervalo de 11 anos

desde a última adição de nutrientes nos tratamentos. O ano 2018 representa o período após a retomada das adições de nutrientes na área experimental.

Em todos os tratamentos e no controle, a amostragem de cada parcela foi realizada a partir do sorteio prévio de cinco pontos amostrais. Em campo, um quadrado de 25x25 cm foi jogado aleatoriamente dentro de cada uma das cinco subdivisões dentro de cada parcela, previamente sorteadas para determinação do ponto de coleta de solo (*bulk soil*). Os sorteios foram realizados antes da primeira coleta em 2017, uma única vez. As amostragens posteriores foram realizadas o mais próximo possível dos pontos anteriormente determinados pelo sorteio.

Em campo, pequenas frações das cinco amostras representantes de cada parcela foram sub amostradas e compostas em uma única amostra por parcela. A amostra composta foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para preservar o material genético. Em laboratório, as amostras já compostas para realização das análises moleculares foram armazenadas a -80°C. O restante do solo coletado foi mantido refrigerado em gelo até a chegada ao laboratório. Para determinação das propriedades químicas do solo e remoção do excesso de raízes, o solo fresco foi destorroado em peneira com malha de 2 mm. Em seguida, as cinco amostras representantes de cada parcela foram novamente compostas em uma única amostra por parcela e fracionadas em sub amostras utilizadas para mensurar as concentrações de diferentes macro nutrientes, teor gravimétrico, pH e matéria orgânica. Para nitrogênio as avaliações de disponibilidade consideraram as formas amônio (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-). A temperatura do solo a 10 cm foi avaliada *in situ*, através do termômetro Digi-Sense®.

Avaliação dos atributos químicos do solo

A caracterização química do solo quanto aos macros nutrientes (exceto N total) foi realizada no Laboratório de Análises de Solos da Universidade de Viçosa-MG, para as amostras da estação chuvosa coletadas em 2017 e 2018. Os elementos fósforo e potássio foram extraídos com o extrator Mehlich1 e determinados por espectrofotometria e espectrofotometria de chama, respectivamente. Os elementos cálcio, magnésio e alumínio foram extraídos com o extrator KCl (1mol/L) e determinados por titulometria. O elemento enxofre foi extraído com fosfato monocálcico em ácido acético e a acidez potencial ($\text{H} + \text{Al}$) com acetato de cálcio tamponado a pH 7,0. Para determinação do carbono orgânico foi empregado o método Walkley-Black. Também foi mensurado o P-remanescente e calculada a capacidade de troca catiônica em pH 7,0 (T) e efetiva (t), a porcentagem de saturação por bases (V), a soma de bases trocáveis (SB) e o índice de saturação por Al (m). Todas as análises seguiram o protocolo estabelecido por EMBRAPA (1997).

O percentual de carbono (TC) e nitrogênio total (TN) foi determinado nas amostras de solo da estação chuvosa coletadas em 2018 através da combustão das amostras sob fluxo contínuo de hélio, em analisador elementar (Carlo Erba, CHN – 1110) acoplado ao espectrômetro de massa Thermo Finnigan Delta Plus.

Análises do pH, teor gravimétrico e das formas inorgânicas de N, foram realizadas no Laboratório de Ecossistemas do Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília e abrangeram todas as estações e anos de coleta. Os valores de pH do solo foram obtidos potenciometricamente com solo seco em água destilada e em solução de CaCl_2 (0.01 M), utilizando o pHmetro Hanna Instruments HI 2221. O teor gravimétrico de água no solo foi determinado pelo cálculo da diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após secagem em estufa a 105°C até peso constante. Para extração de N-NO_3^- e N-NH_4^+ , 2 g de solo de cada amostra foram incubadas sob agitação com 25 mL de KCl 1M durante uma hora à temperatura ambiente. Após agitação, o extrato foi deixado em repouso e posteriormente filtrado. A concentração de N-NO_3^- foi mensurada diretamente por espectrofotometria derivada da leitura de quatro comprimentos de onda: 218 nm, 228 nm, 254 nm e 280 nm (Meier 1991). Estes últimos comprimentos de onda foram aferidos para retirar a interferência da absorbância da matéria orgânica. O N-NH_4^+ foi determinado por análise colorimétrica com o reagente Nessler e sua concentração foi mensurada por espectrofotometria a 425 nm.

Análises moleculares

Extração de DNA

O DNA foi extraído em duplicatas para cada amostra, a partir de 0,5 g de solo com o kit FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals), seguindo as recomendações da fabricante. O DNA extraído foi avaliado quanto a sua concentração e pureza por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Gel Red™ (1:2) e visualizado em transiluminador U.V. (Alpha Innotech®) com posterior fotografia do gel através do programa Alphaview. O DNA total extraído da amostra composta de solo foi submetido a uma etapa adicional de purificação por meio do kit DNeasy PowerClean Pro Cleanup kit (QIAGEN) para remoção de quaisquer resíduos orgânicos que tenham precipitado com o DNA da amostra. O DNA purificado foi quantificado usando o equipamento Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.

Análise do perfil das comunidades microbianas por meio de PCR-RISA

Diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores “domínio específico” foram utilizados para a análise do espaço ribossomal intergênico (RISA, Tabela 2). A técnica é baseada na amplificação de fragmentos com tamanhos variados da região ITS nos diferentes grupos taxonômicos de microrganismos (Gürtler and Stainisich, 1996). Para avaliar o perfil da comunidade bacteriana e de arqueias nos solos, o espaço intergênico entre as regiões codificadoras dos RNAs ribossômicos 16S e 23S foi amplificado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Também foi avaliado o perfil da comunidade de fungos por meio da amplificação da região do espaço intergênico ITS1 – 5,8S - ITS2, entre os genes 18S e 28S. A reação de PCR para todos os grupos foi realizada em volume de 25 μL contendo solução tampão 1X, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,8 mM de cada dNTP, 0,8 U de Taq DNA polimerase Platinum™ (ThermoFisher Scientific), 0,2 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated

DNA Technologies – IDT[®], Tabela 2), e 2 ng de DNA molde. Para os alvos intergênicos de bactéria e arqueia, a amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min. Para o alvo intergênico de fungos, a amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 5 min. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 poços (Applied Biosystems[®]). As reações foram realizadas para todas as amostras coletadas nas estações chuvosa e seca de 2017 e para as amostras do período chuvoso coletadas em 2018.

Os resultados das amplificações foram primeiramente avaliados em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ (1:2) e posteriormente, 15 µL da reação de cada amostra já adicionados a 10 µL Gel Red™ (1:2) foram aplicados em gel de poliacrilamida a 6%. Os fragmentos foram separados por meio de eletroforese durante 2h30min a 130 V. O perfil de bandas foi visualizado em transiluminador U.V. (Alpha Innotech[®]) e o gel foi fotografado com o programa Alphaview. O padrão de bandas do gel foi avaliado no programa *BioNumerics*. Os dendrogramas foram obtidos com emprego do algoritmo UPGMA e coeficiente dissimilaridade DICE. O software calcula a similaridade entre as linhas, considerando a distância e a intensidade relativa das bandas. Os resultados foram inicialmente utilizados para determinar as três amostras por tratamento que seriam enviadas para sequenciamento baseando-se na homogeneidade do perfil de bandas (similaridade) entre as parcelas de cada tratamento.

Tabela 2 Relação dos oligonucleotídeos iniciadores empregados para amplificação do espaço intergênico em Bacteria, Archaea e Fungos e do gene 16S rRNA em Bacteria e Archaea.

| Domínio alvo | Iniciadores | Sequência (5' - 3') | Referência |
|--------------------------------|------------------|--|--|
| Bacteria | BacRISA 1406f | TGY ACA CAC CGC CCG T | (Borneman and Triplett, 1997) |
| | BacRISA 23r | GGG TTB CCC CAT TCR G | |
| Archaea | ArchRISA 915f | AAA GGA ATT GGC GGG GGA GCA C | (Casamayor et al., 2002) |
| | ArchRISA 71r | TCG GYG CCC GAG CCG AGC CAT CC | |
| Fungo | FunRISA 2234C | GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC | (Sequerra et al., 1997) |
| | FunRISA 3126T | ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT | |
| Bacteria/Archaea (16S rRNA) | 515F 806R | GTG YCA GCM GCC GCG GTA A GTG YCA GCM GCC GCG GTA A | (Aprill et al., 2015; Parada et al., 2016) |

Sequenciamento

Três amostras de DNA metagenômico por tratamento e por estação (30 amostras no total) foram enviadas para sequenciamento pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea). A preparação das bibliotecas e um novo controle de qualidade das amostras para sequenciamento foi realizado pela MacroGen. As bibliotecas foram construídas a partir da amplificação da região V4 do gene 16S rRNA (Bacteria e Archaea) usando os oligonucleotídeos iniciadores universais 515F e 806R (Tabela 2). O sequenciamento dos *amplicons* foi realizado na plataforma *Illumina Next Generation Sequencer* MiSeq PE300, com emprego dos adaptadores *Nextera XT Index Kit V2* e da enzima *Herculase II Fusion DNA Polymerase*. Os protocolos para o preparo das reações seguiram as indicações do Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/>) (Thompson et al., 2017).

O processamento dos dados foi realizado no QIIME 2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology 2, versão 2019.4). Inicialmente todas as sequências de controle *phiX* e os adaptadores *Nextera* foram removidos das bibliotecas já demultiplexadas usando o padrão de parâmetros do *bbduk.sh* no *BBMap* (Bushnell, 2014). Um arquivo *manifest.csv* foi criado para carregamento das sequências no QIIME 2 com o formato de leitura utilizado pelo programa (*.qza*) através do comando *qiime tools import*. Os oligonucleotídeos iniciadores foram removidos com *cutadapt* (Martin, 2011). O controle de qualidade das sequências foi realizado com o *plugin* DADA2 que infere um conjunto de ASVs (*amplicon sequence variants*) através de um algoritmo capaz de corrigir erros de sequenciamento e gera uma distribuição de abundância capaz de diferir sequências em nível de um único nucleotídeo (Callahan et al., 2017). As sequências *forward* e *reverse* foram cortadas (baseado nos *scores* de qualidade) nas posições 260 e 230 pb, respectivamente, usando o comando *qiime dada2 denoise-paired* e unidas

com mínimo de sobreposição de 20 pb, gerando sequencias com tamanhos entre 270 e 486 pb. Adicionalmente, através do mesmo comando, possíveis *chimeras* foram removidas. A anotação taxonômica foi atribuída considerando o percentual de identidade de 99% com as sequencias de referência do banco de dados SILVA versão 132 (Pruesse et al., 2007), através do comando *qiime feature-classifier classify-sklearn*. O alinhamento das sequencias foi realizado através do método MAFFT (Katoh and Standley, 2013) e a árvore filogenética foi construída utilizando FastTree (Price et al., 2009). A distribuição taxonômica entre as amostras foi calculada com o comando *qiime taxa barplot*. Os arquivos gerados no Qiime 2 foram usados como dados de entrada no R (versão 3.6.1). Todas as ASVs anotadas como não classificadas, mitocôndria ou cloroplasto foram removidas. *Singletons* também foram removidos. O banco de dados foi analisado separadamente por domínio (Bacteria e Archaea). O banco de dados Bacteria foi ainda filtrado para incluir somente os grupos que representavam acima de 0,3% da comunidade bacteriana total encontrada, resultando em 17 entre os 41 filos bacterianos primariamente anotados.

Dados da vegetação

Considerando a grande importância da vegetação no Cerrado e a sua provável influência sobre a microbiota do solo, dados de abundância de dois grupos funcionais da vegetação herbácea (C4 nativa e C3 exótica) presentes na área do experimento de adição de nutrientes foram obtidos pelo método de cobertura linear (método de Canfield) e disponibilizados por Mello (2019).

Análises de diversidade microbiana e análises estatísticas

Todas as análises de diversidade e análises estatísticas foram processadas no R (versão 3.6.1). O pacote phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) foi inicialmente usado para gerar os gráficos de rarefação e gráficos de barras representando a abundância relativa e o número médio de *reads* assinados para cada *taxa*. As diferenças ($p < 0,05$) na proporção média dos filos bacterianos entre os tratamentos foram testadas por meio do teste White's non parametric t-test com correção Benjamini FDR no *software* STAMP (Parks et al., 2014). Para descrever e pontuar as variações na abundância relativa dos grupos bacterianos com frequência maior que 1% (em nível de família, considerando a partir da distribuição de classe) associados aos três filos dominantes na área, uma tabela foi construída com a comparação do percentual médio relativo de cada táxon por tratamento e por estação.

As métricas de α e β diversidade da comunidade microbiana nos solos foram computadas usando os pacotes microbiomeSeq (Ssekagiri et al., 2017) e phyloseq após a normalização dos dados pela mediana da profundidade do sequenciamento. O cálculo das métricas de α -diversidade incluíram as medidas de riqueza estimada (*Richness*) e o índice de diversidade Shannon, cujas médias entre os pares foram automaticamente comparadas por meio de uma ANOVA. A diversidade filogenética (Faith's PD) também foi estimada.

Adicionalmente, outros estimadores de α -diversidade (não filogenética: riqueza observada, Chao1, ACE e Fisher) foram calculados e apresentados no material suplementar.

Diferentes métodos de ordenação foram empregados para avaliação de β -diversidade. Para avaliar a distribuição comunidade microbiana entre as amostras, foi empregada a análise de ordenação de coordenadas principais (PCoA) baseado na distância UniFrac ponderada usando o pacote phyloseq. Uma análise canônica de coordenadas principais (CAP) baseada em RDA e distância Bray-Curtis foi plotada para avaliar o comportamento da comunidade em função da variação nas propriedades ambientais e da vegetação. Uma PERMANOVA (*permutation analysis of variance*) foi testada identificar as diferenças ($p < 0,05$) no padrão de beta-dispersão da comunidade microbiana entre os tratamentos e estações. Adicionalmente, outros diferentes métodos de ordenação foram plotados e apresentados no material suplementar.

Valores LCBD (*comparative indicators of the ecological uniqueness of the sites*) foram calculados para medir o grau de importância de uma determinada amostra para a variação na composição da comunidade (Legendre and Cáceres 2013) com o uso do pacote microbiomeSeq. O cálculo foi realizado para cada um dos três filos bacterianos dominantes na área e levou em consideração o nível taxonômico de família para gerar o gráfico. O gráfico de barras gerado destaca a proporção das dez famílias mais abundantes de cada um dos filos, com valores normalizados pela abundância relativa. Os valores LCBD correspondentes a uma determinada amostra são apresentados como pontos cujo diâmetro corresponde à magnitude do valor de contribuição de cada local para a β -diversidade.

As diferenças ($p < 0,05$) nas propriedades químicas do solo entre os tratamentos foram avaliadas por meio de ANOVA. Os dados obtidos nas duas estações foram submetidos à ANOVA two-way para avaliar as possíveis interações entre tratamento e estação. Comparações *post-hoc* foram realizadas por meio do teste Tukey HSD. Os resíduos foram testados quanto à sua normalidade e homocedasticidade através dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Adicionalmente os gráficos de resíduos gerados foram também avaliados. Os dados que não atenderam aos pressupostos da ANOVA foram transformados (BoxCox).

RESULTADOS

Efeitos de longo e curto prazo das adições de nutrientes no solo

A avaliação prévia das principais propriedades do solo realizada no período anterior à retomada das adições de nutrientes (2017, período chuvoso) mostrou que as diferenças nas propriedades químicas do solo persistiram mesmo após 11 anos sem novas adições de nutrientes (Tabela 3). Essas diferenças incluíram alterações principalmente nos valores de pH do solo, nas concentrações de Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , MO e P disponível (Tabela 3). O pH foi maior no tratamento Ca (controle: 4.55 vs. Ca: 5.92) e menor nos tratamentos N (3.93), NP (3.75) e P (3.99). Os cátions trocáveis, Ca^{2+} (controle: 0.12 vs. Ca: 5.67 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) e Mg^{2+} (controle: 0.08 vs. Ca: 3.33 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) também tiveram suas concentrações aumentadas no tratamento Ca. Por outro lado, a

concentração de K^+ foi reduzida no tratamento Ca, bem como a quantidade de MO (controle: 7,08 vs. Ca: 5,82 dag/kg) e a concentração de Al^{3+} , que permaneceu em zero neste tratamento (controle: 1,20 vs. Ca: 0,00 $cmol_c/dm^3$). A concentração de P disponível manteve-se aumentada nos tratamentos com adição desse nutriente (controle: 0,63 vs. NP: 10,40; P: 11,50 mg/dm^3). As concentrações do $N-NO_3^-$ variaram entre 0,61 mg/kg (Ca) e 1,95 mg/kg (P) e as concentrações de $N-NH_4^+$ variaram entre 15,48 mg/kg (NP) e 25,06 mg/kg (controle). O teor gravimétrico de água no solo variou entre 23,41 e 27,65% e a temperatura variou entre 18,66 e 20,12 °C. Os dados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 Propriedades químicas do solo (0 – 10 cm) coletados na estação chuvosa de 2017, 11 anos após a última fertilização, em experimento de longa duração de adição de nutrientes localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Números em negrito destacam os maiores valores de cada parâmetro observado entre os tratamentos. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: adição de fósforo.

| Tratamento (Estação chuvosa - 2017) | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| | Controle | Ca | N | NP | P | |
| pH | 4,55 \pm 0,06 | 5,92 \pm 0,19 | 3,93 \pm 0,04 | 3,75 \pm 0,13 | 3,99 \pm 0,05 | |
| Al^{3+} ($cmol_c/dm^3$) | 1,20 \pm 0,17 | 0,00 \pm 0,00 | 1,47 \pm 0,15 | 1,53 \pm 0,21 | 1,43 \pm 0,21 | |
| Ca^{2+} ($cmol_c/dm^3$) | 0,12 \pm 0,03 | 5,67 \pm 0,53 | 0,13 \pm 0,03 | 0,21 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,04 | |
| Mg^{2+} ($cmol_c/dm^3$) | 0,08 \pm 0,01 | 3,33 \pm 0,37 | 0,06 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 | |
| K^+ (mg/dm^3) | 30,00 \pm 6,56 | 11,33 \pm 3,21 | 20,00 \pm 2,00 | 20,00 \pm 4,36 | 49,33 \pm 45,62 | |
| MO (dag/kg) | 7,08 \pm 0,51 | 5,82 \pm 0,56 | 7,03 \pm 0,51 | 7,61 \pm 0,60 | 8,01 \pm 1,02 | |
| P (disponível, mg/dm^3) | 0,53 \pm 0,06 | 1,30 \pm 0,40 | 0,40 \pm 0,17 | 10,40 \pm 2,43 | 11,50 \pm 3,84 | |
| $N-NO_3^-$ (mg/kg) | 1,54 \pm 0,84 | 0,61 \pm 0,05 | 1,59 \pm 0,30 | 1,75 \pm 0,17 | 1,95 \pm 0,66 | |
| $N-NH_4^+$ (mg/kg) | 25,06 \pm 2,90 | 20,97 \pm 3,88 | 19,93 \pm 2,67 | 15,48 \pm 4,09 | 19,25 \pm 5,83 | |
| Teor gravimétrico (%) | 23,41 \pm 3,22 | 27,65 \pm 2,62 | 27,17 \pm 1,63 | 27,52 \pm 1,27 | 26,80 \pm 1,32 | |
| Temperatura (°C) | 19,03 \pm 0,38 | 18,66 \pm 0,65 | 19,15 \pm 1,04 | 18,93 \pm 1,77 | 20,12 \pm 1,35 | |

Entre as variáveis mensuradas no período chuvoso de 2018 (Tabela 4), somente o carbono (TC) e o nitrogênio total (TN) do solo não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$), variando entre 3,87 e 3,48% e entre 0,20 e 0,17% (controle vs. Ca), respectivamente. Apesar desse resultado, a razão CN (C:N) foi maior no tratamento Ca ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos N, NP e P (Ca: 20,44 vs. N: 18,72, NP: 18,62; P: 19,00). Outras variáveis químicas do solo também diferiram significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$). As concentrações de P disponível foram cerca de quatro vezes maiores nos tratamentos com adição desse nutriente (controle: 1,77 vs. NP: 7,53 e P: 6,93 mg/dm^3) e o P Remanescente (P-Rem) foi maior no tratamento Ca em relação ao controle e ao tratamento N (controle: 16,93 e N: 16,80 vs. Ca: 21,20 mg/L). As concentrações de Ca^{2+} (controle: 0,21 vs. Ca: 4,62 mg/dm^3) e Mg^{2+} (controle: 0,12 vs. Ca: 2,77 $cmol_c/dm^3$) foram significativamente maiores no tratamento Ca em relação ao controle e aos demais tratamentos, com a soma de

bases (SB) e o índice de saturação por bases (V) alcançando em média 7,42 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$ e 83,30%, respectivamente, valores quase 20 vezes maiores que aqueles encontrados entre as parcelas do controle (SB: 0,41 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$ e V: 4,20%). Por outro lado, as concentrações de K^+ (controle: 31,67 vs. Ca: 10,67 mg/dm^3) e Al^{3+} (controle: 0,97 vs. Ca: 0,00 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$), a acidez potencial (H+Al; controle: 9,57 vs. Ca: 1,50 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) e a saturação por alumínio (m; controle: 69,63 vs. Ca: 0,00%) foram significativamente reduzidas no tratamento Ca. A concentração de K^+ também foi reduzida no tratamento N (22,67 mg/dm^3). A concentração de Al^{3+} e a H+Al foram maiores no tratamento NP (Al^{3+} : 1,46 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$; H+Al: 10,67 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) enquanto o m foi maior no tratamento N em relação ao tratamento NP (N: 82,60 vs. NP: 68,73%). A capacidade de troca catiônica efetiva (CTC) foi maior nos tratamentos Ca e NP (controle: 1,38 vs. Ca: 7,42 vs. NP: 2,12 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) e a capacidade de troca catiônica em pH 7,0 (T) foi maior no tratamento NP em relação ao tratamento Ca (NP: 11,33 vs. Ca: 8,92 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$).

As amostras do tratamento Ca apresentaram os maiores valores de pH do solo ($p < 0,05$), chegando a 6,24 na estação chuvosa e 6,07 na estação seca, enquanto os tratamentos N (3,74 vs. 3,63), NP (3,74 vs. 3,63) e P (4,10 vs. 3,70) apresentaram os menores valores, nas duas estações. Houve variações sazonais do pH, que diminuiu da estação chuvosa para a estação seca no controle (4,73 vs. 4,02; $p < 0,05$) e no tratamento P (4,10 vs. 3,70; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças nas concentrações de N-NO_3^- entre os tratamentos ($p > 0,05$) durante a estação chuvosa. Por outro lado, as concentrações de N-NO_3^- diminuíram na estação seca apresentando valores significativamente reduzidos ($p < 0,05$) nos tratamentos N (0,90 mg/kg) e NP (0,70 mg/kg). As concentrações de N-NH_4^+ foram maiores no tratamento NP (133,00 mg/kg) durante a estação chuvosa ($p < 0,05$) e não houve diferenças entre os tratamentos durante a estação seca ($p > 0,05$). Sazonalmente, todos os tratamentos apresentaram redução nas concentrações de N-NH_4^+ da estação chuvosa para a estação seca ($p < 0,05$). Os dados são apresentados na Tabela 5.

O teor gravimétrico de água e a temperatura do solo diferiram ($p < 0,05$) apenas entre as estações. O maior percentual do teor gravimétrico e maior temperatura foram encontradas durante a estação chuvosa (Fig. 2). Neste período, o teor gravimétrico alcançou 37,6% contra 24,2% na estação seca, e a variação na temperatura do solo ficou entre 22,1°C e 18,4°C.

Tabela 4 Propriedades químicas dos solos (0-10 cm) mensuradas durante a estação chuvosa de 2018 em diferentes tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As diferentes letras representam as diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos \pm desvio padrão ($n = 3$). Maiores valores destacados em negrito. Variáveis transformadas (BoxCox) para análise estatística indicadas com asterisco (*). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). ANOVA, teste TukeyHSD para comparação de médias. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: dição e fósforo.

| | Tratamento | | | | |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | C | Ca | N | NP | P |
| TC (%) | 3,87 \pm 0,51 a | 3,48 \pm 0,18 a | 3,55 \pm 0,48 a | 3,76 \pm 0,33 a | 3,73 \pm 0,41 a |
| TN (%) | 0,20 \pm 0,02 a | 0,17 \pm 0,01 a | 0,19 \pm 0,02 a | 0,20 \pm 0,02 a | 0,20 \pm 0,02 a |
| C:N | 19,12 \pm 0,86 ab | 20,44 \pm 0,35 a | 18,72 \pm 0,44 b | 18,62 \pm 0,29 b | 19,00 \pm 0,50 b |
| Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0,21 \pm 0,01 ac | 4,62 \pm 0,18 b | 0,15 \pm 0,03 c | 0,46 \pm 0,15 a | 0,28 \pm 0,07 ac |
| Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0,12 \pm 0,01 a | 2,77 \pm 0,15 b | 0,08 \pm 0,02 a | 0,14 \pm 0,09 a | 0,10 \pm 0,03 a |
| K (mg/dm ³) | 31,67 \pm 2,52 a | 10,67 \pm 2,31 b | 22,67 \pm 4,16 c | 27,67 \pm 3,51 ac | 26,67 \pm 3,06 ac |
| P disponível (mg/dm ³)* | 1,77 \pm 0,40 a | 0,73 \pm 0,35 a | 1,23 \pm 0,12 a | 7,53 \pm 3,23 b | 6,93 \pm 3,17 b |
| P-Rem (mg/L) | 16,93 \pm 0,92 a | 21,20 \pm 0,20 b | 16,80 \pm 1,91 a | 17,77 \pm 1,81 ab | 19,30 \pm 0,72 ab |
| SB (cmol _c /dm ³) | 0,41 \pm 0,01 a | 7,42 \pm 0,27 b | 0,29 \pm 0,05 a | 0,67 \pm 0,21 a | 0,45 \pm 0,09 a |
| V (%) | 4,20 \pm 0,36 a | 83,30 \pm 2,79 b | 2,83 \pm 0,25 a | 5,90 \pm 1,85 a | 4,63 \pm 0,90 a |
| CTC (cmol _c /dm ³) | 1,38 \pm 0,19 a | 7,42 \pm 0,27 b | 1,64 \pm 0,22 ac | 2,12 \pm 0,12 c | 1,58 \pm 0,27 ac |
| T (cmol _c /dm ³) | 9,98 \pm 0,70 ab | 8,92 \pm 0,58 a | 10,09 \pm 1,20 ab | 11,33 \pm 0,46 b | 9,85 \pm 1,20 ab |
| Al ³⁺ (cmol _c /dm ³) | 0,97 \pm 0,20 a | 0,00 \pm 0,00 b | 1,35 \pm 0,17 ac | 1,46 \pm 0,17 c | 1,13 \pm 0,25 ac |
| H+Al (cmol _c /dm ³) | 9,57 \pm 0,71 a | 1,50 \pm 0,35 b | 9,80 \pm 1,15 a | 10,67 \pm 0,57 a | 9,40 \pm 1,18 a |
| m (%) | 69,63 \pm 4,64 ac | 0,00 \pm 0,00 b | 82,60 \pm 0,82 a | 68,73 \pm 8,60 c | 71,07 \pm 5,43 ac |

TC – carbono total; TN – nitrogênio total; SB – soma de bases trocáveis; CTC - capacidade de troca catiônica efetiva; T – capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V – índice de saturação por bases; H+Al – acidez potencial; m – índice de saturação por alumínio.

Tabela 5 Propriedades químicas dos solos (0-10 cm) mensuradas durante as estações chuvosa e seca de 2018 nos tratamentos do experimento de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As diferentes letras representam as diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos \pm desvio padrão ($n = 3$). Os asteriscos (*) destacam as diferenças sazonais ($p < 0,05$) para cada tratamento. ANOVA, teste TukeyHSD para comparação de médias. Controle: sem adições, Ca: calagem, N: adição de nitrogênio, NP: adição de nitrogênio e fósforo, e P: dição e fósforo.

| | pH | | N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | | N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | |
|--------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|
| Chuva | | | | | | |
| C | 4,73 \pm 0,20 a | * | 2,19 \pm 0,23 a | | 29,60 \pm 1,61 a | * |
| Ca | 6,24 \pm 0,11 b | | 2,22 \pm 0,76 a | | 27,20 \pm 5,35 a | * |
| N | 3,74 \pm 0,07 c | | 2,40 \pm 0,50 a | * | 43,80 \pm 15,00 a | * |
| NP | 3,72 \pm 0,13 c | | 1,70 \pm 0,65 a | * | 133,00 \pm 24,7 b | * |
| P | 4,10 \pm 0,08 d | * | 2,52 \pm 0,72 a | | 37,00 \pm 25,2 a | * |
| Seca | | | | | | |
| C | 4,02 \pm 0,10 a | * | 1,65 \pm 0,13 a | | 9,36 \pm 1,14 a | * |
| Ca | 6,07 \pm 0,06 b | | 1,76 \pm 0,36 a | | 7,79 \pm 1,04 a | * |
| N | 3,63 \pm 0,03 c | | 0,90 \pm 0,21 ab | * | 6,60 \pm 0,50 a | * |
| NP | 3,83 \pm 0,23 ac | | 0,70 \pm 0,30 b | * | 7,40 \pm 0,76 a | * |
| P | 3,70 \pm 0,06 c | * | 1,28 \pm 0,24 ab | | 6,65 \pm 0,22 a | * |

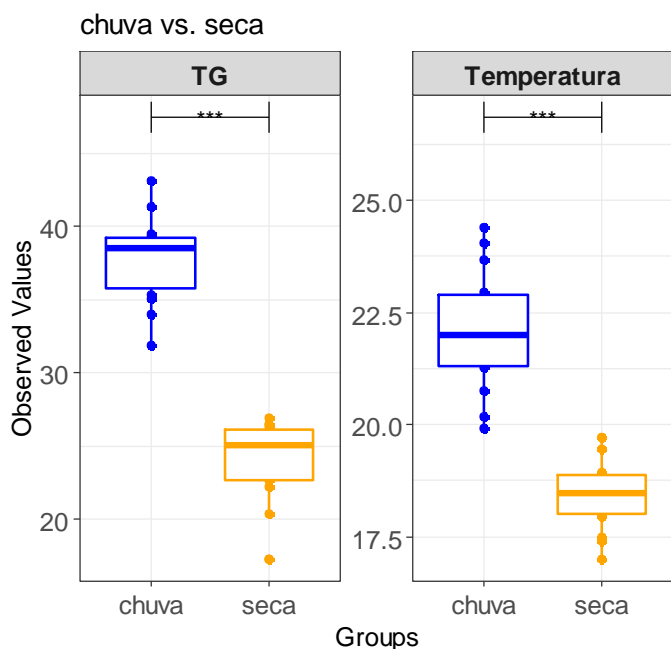


Fig. 2 Diferenças sazonais no teor gravimétrico de água no solo (TG, %) e nos valores de temperatura (°C) do solo (0-10 cm) mensurados durante as estações chuvosa e seca de 2018 na área do experimento de adição de nutrientes. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As linhas associadas aos asteriscos indicam as diferenças na comparação entre as estações. ANOVA; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Análise do perfil das comunidades microbianas por meio de PCR-RISA

A partir da técnica de análise do espaço intergênico ribossomal (RISA), avaliamos o perfil da comunidade de bactérias, arqueias e fungos presentes nos solos dos quatro tratamentos de adição de nutrientes (Ca, N, NP e P) e controle. A técnica foi inicialmente empregada para a escolha de três entre as quatro amostras de DNA do solo de cada tratamento que foram enviadas para sequenciamento baseando-se na homogeneidade do perfil de bandas (similaridade) entre as parcelas de cada tratamento (Fig. S2).

A comunidade bacteriana não apresentou perfis passíveis de leitura durante a estação seca (2017) e foi, portanto, ausente nas análises. Desta forma, a comunidade bacteriana foi avaliada nas estações chuvosas de 2017 e 2018, enquanto as comunidades de arqueias e fungos foram avaliadas nas estações chuvosa e seca de 2017 e na estação chuvosa de 2018.

Os perfis eletroforéticos das comunidades microbianas obtidos apresentaram grande número de bandas para a maioria das amostras. De modo geral, os resultados dos agrupamentos apontaram para um efeito da sazonalidade e da adição de nutrientes sobre os perfis das comunidades nos três domínios (Figs. 3, 4 e 5). A comunidade bacteriana foi inicialmente agrupada em dois grandes grupos com aproximadamente 22% de similaridade na comparação que incluiu amostras da estação chuvosa. Nesta comparação não há um efeito evidente da adição de nutrientes em curto prazo (2017 vs. 2018) no padrão de bandas de todos os tratamentos (Fig. S2). No entanto, algumas diferenças pontuais entre os tratamentos foram observadas. Por exemplo, no período anterior às novas adições foi possível observar o agrupamento das parcelas do controle em um *cluster* isolado. Também foi observado que amostras do controle e das parcelas com adição de N se agruparam em um

cluster com aproximadamente 62% de similaridade após a retomada das adições de nutrientes. Quando as amostras de cada ano foram observadas isoladamente, o efeito das adições de nutrientes sobre o perfil da comunidade bacteriana é visualmente marcante (Fig. 3). As análises multivariadas dos perfis da comunidade bacteriana avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e método UPGMA para construção dos agrupamentos no programa BioNumerics® são representadas na Fig. 3 e Fig. S2.

Na comunidade de arqueias observou-se a formação de um grande *cluster* que agrupou a maioria das amostras da estação seca com aproximadamente 69% de similaridade, com exceção das parcelas do tratamento NP, cujas parcelas foram agrupadas em um *cluster* separado. No período chuvoso anterior à retomada das adições de nutrientes observou-se um *cluster* com agrupamento das amostras do controle com 80% de similaridade mínima entre as parcelas e a formação de outro *cluster* com o agrupamento das parcelas do tratamento Ca com 64.6% de similaridade. Após a adição de nutrientes, observa-se o efeito dos tratamentos sobre o perfil da comunidade de arqueias com o agrupamento das parcelas do controle, Ca, N e NP (Fig. S3). Quando cada período é observado isoladamente (Fig. 4), o efeito dos tratamentos é visualmente bem definido, com a formação dos agrupamentos por tratamento, nos três períodos avaliados. As análises multivariadas dos perfis da comunidade de arqueias avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e método UPGMA para construção dos agrupamentos no programa BioNumerics® são representadas na Fig. 4 e Fig. S3.

Na comunidade de fungos os efeitos dos tratamentos não apresentam um padrão claro. Visualmente, o efeito da estação chuvosa ou da retomada da adição de nutrientes em 2018 é mais evidente, com o agrupamento da maioria das amostras dos diferentes tratamentos em um *cluster* com 68.3% de similaridade. Ao comparar isoladamente cada período (Fig. 5), observa-se o provável efeito do tratamento NP sobre o perfil da comunidade de fungos, com agrupamento das parcelas NP em aproximadamente 82% e 62% nas estações chuvosa e seca de 2017, respectivamente. Após a retomada das adições, observa-se a formação de um *cluster* isolado com as parcelas do tratamento Ca, contando aproximadamente 82% de similaridade entre si e 53% de similaridade com as demais amostras distribuídas em diferentes *clusters*. As análises multivariadas dos perfis da comunidade de fungos avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e método UPGMA para construção dos agrupamentos no programa BioNumerics® são representadas na Fig. 5 e Fig. S4.

Por meio destes resultados, três, entre as quatro amostras de DNA do solo de cada tratamento, foram escolhidas para sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram sequenciadas as amostras destacadas na Fig. S2. As amostras de DNA do solo sequenciadas abrangeram as mesmas parcelas de cada tratamento nas estações chuvosa e seca de 2018, período após a retomada das adições de nutrientes na área do experimento. Além disso, os resultados obtidos por meio do RISA, juntamente com a avaliação das propriedades químicas do solo, foram importantes no entendimento dos efeitos de longo prazo das adições de nutrientes sobre a comunidade microbiana do solo que estão discutidas no decorrer deste estudo.

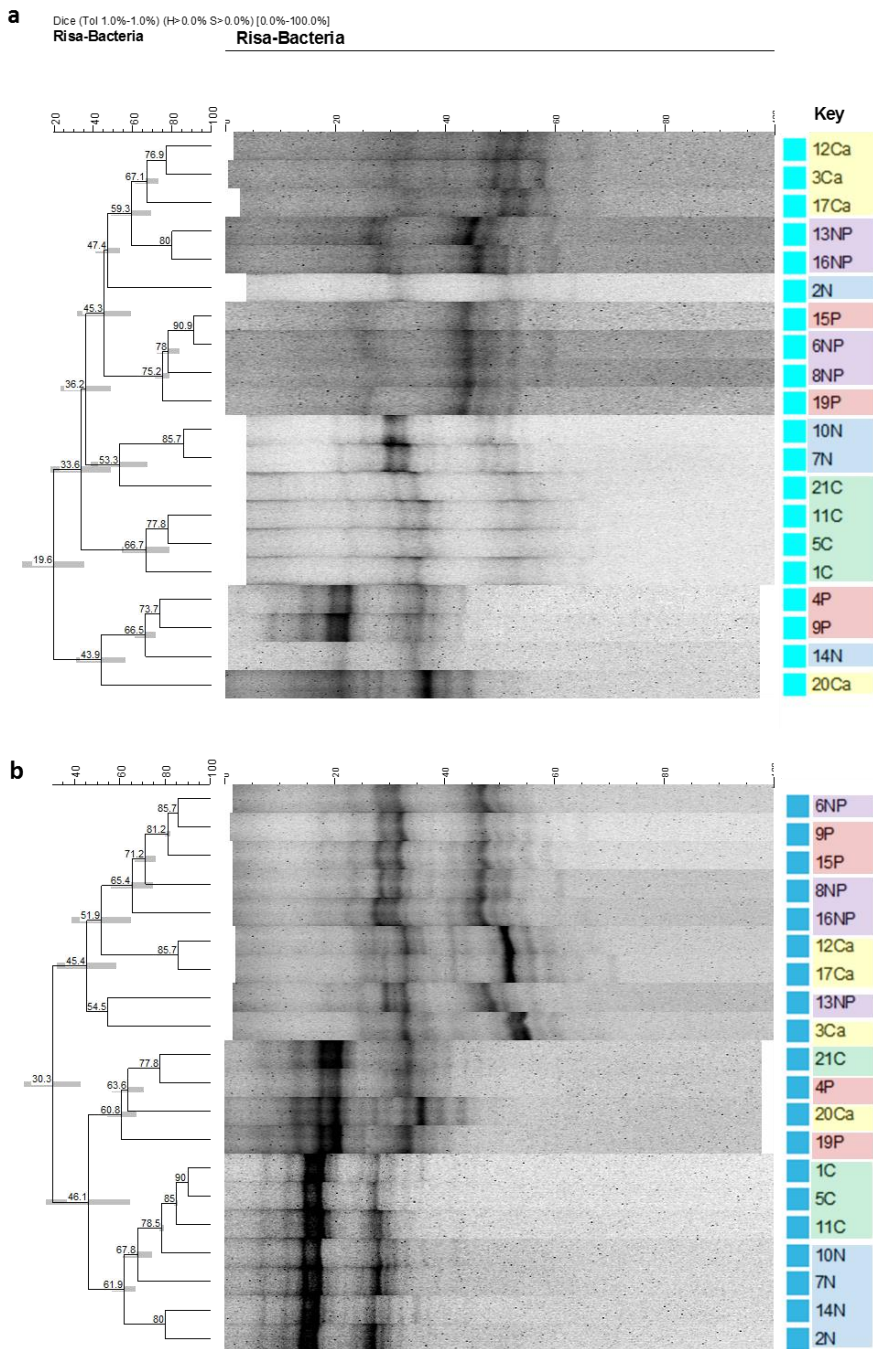


Fig. 3 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade bacteriana em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosas de 2017 **(a)** e 2018 **(b)** indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa).

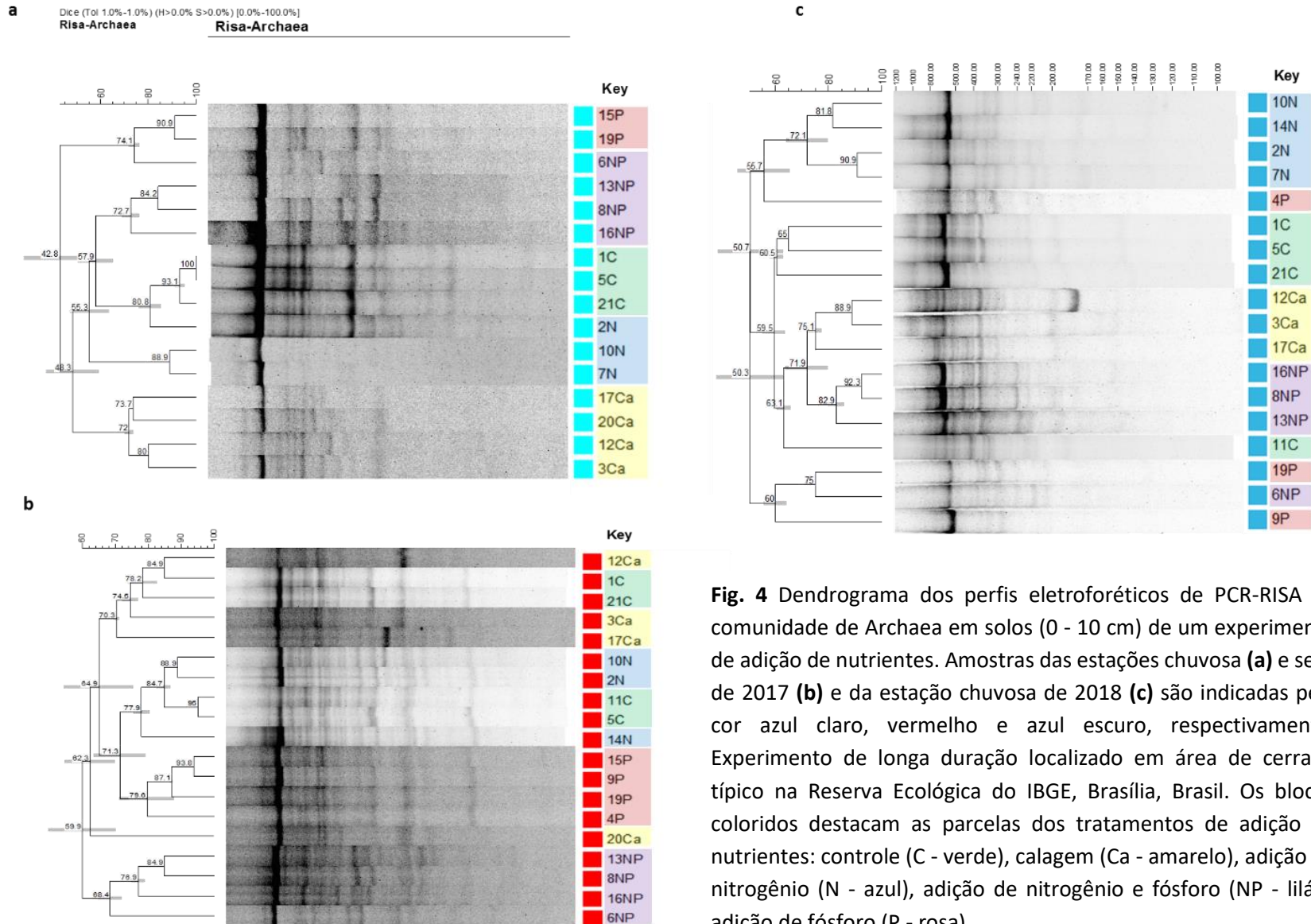


Fig. 4 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade de Archaea em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosa **(a)** e seca de 2017 **(b)** e da estação chuvosa de 2018 **(c)** são indicadas pela cor azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa).

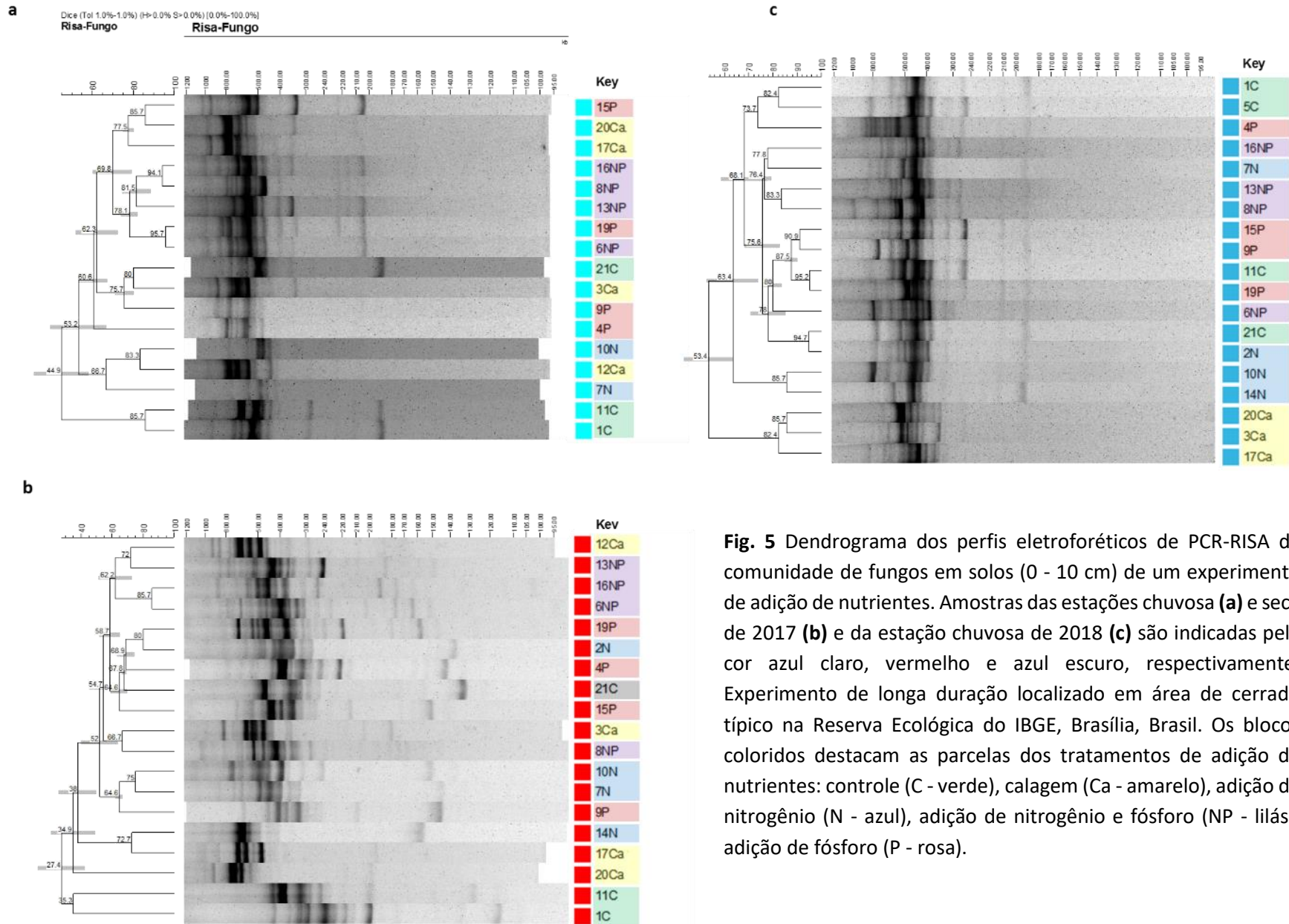


Fig. 5 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA da comunidade de fungos em solos (0 - 10 cm) de um experimento de adição de nutrientes. Amostras das estações chuvosa (**a**) e seca de 2017 (**b**) e da estação chuvosa de 2018 (**c**) são indicadas pela cor azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa).

Caracterização da comunidade microbiana do solo

A identidade e abundância da comunidade de Bacteria e Archaea presentes no solo das parcelas experimentais foram acessadas a partir do sequenciamento do gene marcador 16S rRNA. Dentro do total de 2.722.684 sequências não quiméricas obtidas, apenas 1% (41.159) foram representativas do domínio Archaea (Fig. 6). Após a separação dos bancos de dados por domínio e aplicação de todos os filtros de qualidade, a cobertura variou entre 192 e 2708 sequências atribuídas a Archaea e de 64.557 a 100.775 sequências atribuídas a Bacteria (Fig. S5).

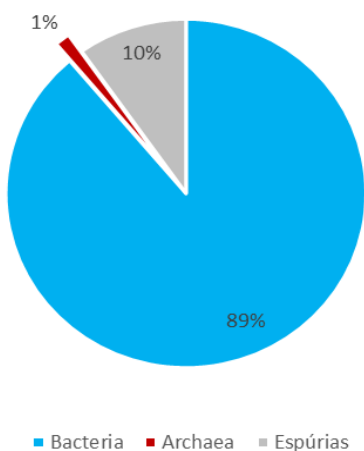


Fig. 6 Distribuição do percentual de sequências não quiméricas atribuídas aos domínios Archaea e Bacteria após aplicação dos filtros para remoção de sequências espúrias (*singletons*, “mitocôndria”, “cloroplasto” e não classificadas).

Bacteria

A curva de rarefação indicou que a profundidade de sequenciamento foi suficiente para estimar a riqueza e diversidade bacteriana, de modo que o aumento da amostragem não aumentaria significativamente o número de ASVs encontradas (Fig. 7).

A comunidade bacteriana no experimento de adição de nutrientes foi preliminarmente representada por 41 filós. Dentro destes grupos, 24 filós classificados representaram juntos menos de 0.3% da comunidade e foram excluídos das análises. Considerando o remanescente dos grupos analisados, 15412 *taxa* bacterianas distribuídos em 17 filós, 100 classes, 364 ordens, 666 famílias, 1233 gêneros foram contabilizados entre o total de amostras (n=30). Por incluir muitos grupos anotados apenas como “não cultivados” nos níveis taxonômicos abaixo de filo, as informações taxonômicas descritas se limitaram ao nível de ordem e famílias com nomenclatura validada.

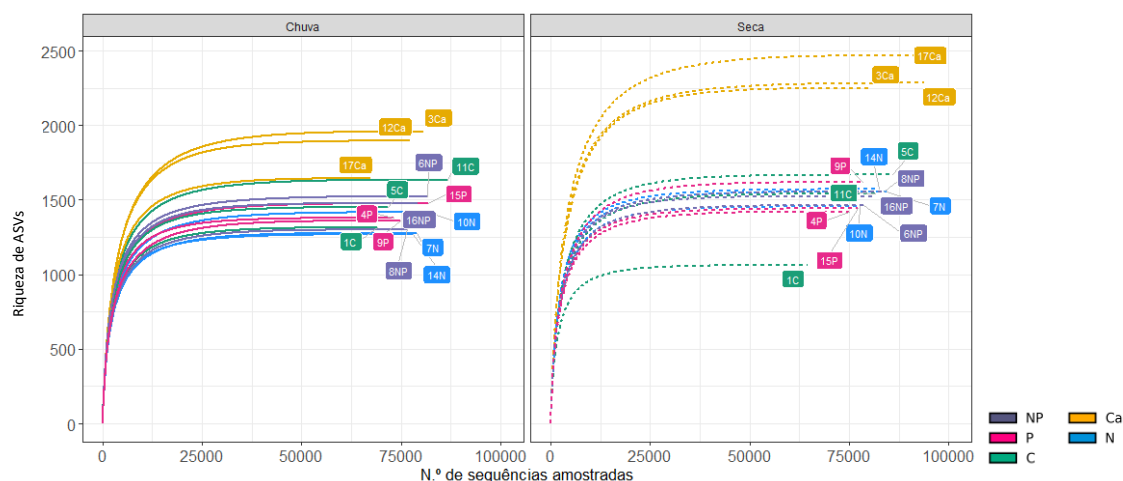


Fig. 7 Curvas de rarefação da comunidade bacteriana obtida por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras de solo (0-10cm) das parcelas do experimento de adição de nutrientes, nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), e adição de fósforo (P).

Os filos Proteobacteria (25,7%), Acidobacteria (21,1%), Chloroflexi (18,5%), Actinobacteria (11,6%), Verrucomicrobia (7,1%), Planctomycetes (7,1%), WPS-2 (3,0%), Gemmatimonadetes (1,9%) e Bacteroidetes (1,2%) representaram os grupos com maior abundância relativa ($\geq 1\%$ da comunidade total considerando todos os tratamentos e estações). Os filos com abundância relativa menor que 1% dentro da comunidade (considerados grupos raros) foram Armatimonadetes (0,8%), GAL15 (0,6%), Rokubacteria (0,3%), Patescibacteria (0,3%), Elusimicrobia (0,2%), Latescibacteria (0,2%) e Firmicutes (0,1%) e Cyanobacteria (0,1%). A composição taxonômica em nível de filo da comunidade bacteriana do solo e suas respectivas abundâncias nas parcelas do experimento de adição de nutrientes são apresentadas na Fig. 8.

Entre os filos mais abundantes, Proteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi dominaram entre as amostras dos quatro tratamentos e controle (Figs. 8 e 9), somando aproximadamente 65% da comunidade presente. Apesar da grande abundância, em geral as proporções médias destes e dos outros filos variaram entre os tratamentos de adição de nutrientes, especialmente no tratamento Ca, onde foram encontradas as principais diferenças na proporção dos grupos. Ao todo, foram encontradas diferenças nas proporções médias de 12 entre os 17 filos mantidos nas análises (Fig. 9; Fig. S6). O tratamento Ca forma um *cluster* isolado das demais amostras, que são agrupadas em outros dois grandes *clusters*. Em geral, as amostras do controle foram agrupadas próximas às amostras dos tratamentos P e N associadas à estação seca (Fig. 9a).

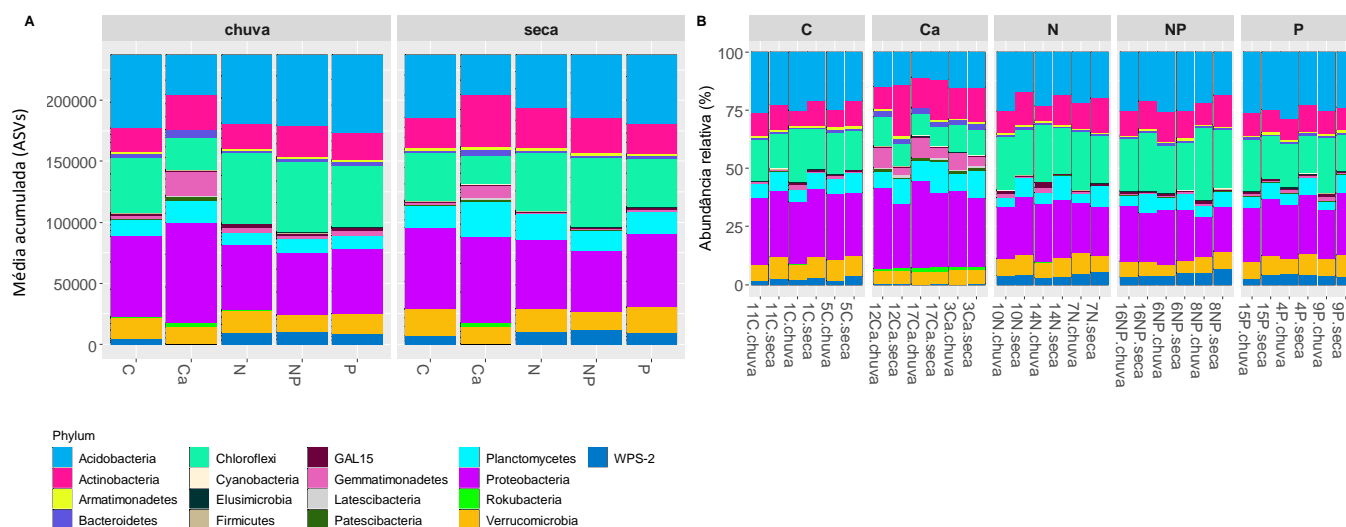


Fig. 8 Média acumulada do número de ASVs assinadas para cada taxa por tratamento (a) e abundância relativa por parcela (b) dos 17 filis representativos da comunidade bacteriana (abundantes e raros) do solo no experimento de adição de nutrientes durante as estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico, localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: Controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (P).

Houve aumento da proporção média dos filis Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Patescibacteria e Rokubacteria no tratamento Ca em relação ao controle ($p < 0.05$). Os filis Chloroflexi e WPS-2 apresentaram maior proporção média no tratamento N em relação ao controle ($p < 0.05$). WPS-2 também foi encontrado com maior abundância no tratamento NP comparado ao controle e Elusimicrobia apresentou maior proporção média no tratamento P ($p < 0.05$). Por outro lado, os filis Acidobacteria, Chloroflexi, Verrucomicrobia, WPS-2 apresentaram menor proporção média no tratamento Ca ($p < 0.05$). Verrucomicrobia também apresentou menor abundância no tratamento NP e Proteobacteria apresentou menor proporção relativa nos tratamentos N, NP e P comparado ao controle ($p < 0.05$). As comparações entre tratamento e controle são representadas na Fig. 9b. Outras comparações das proporções médias entre os diferentes tratamentos são apresentadas na Fig. S6.

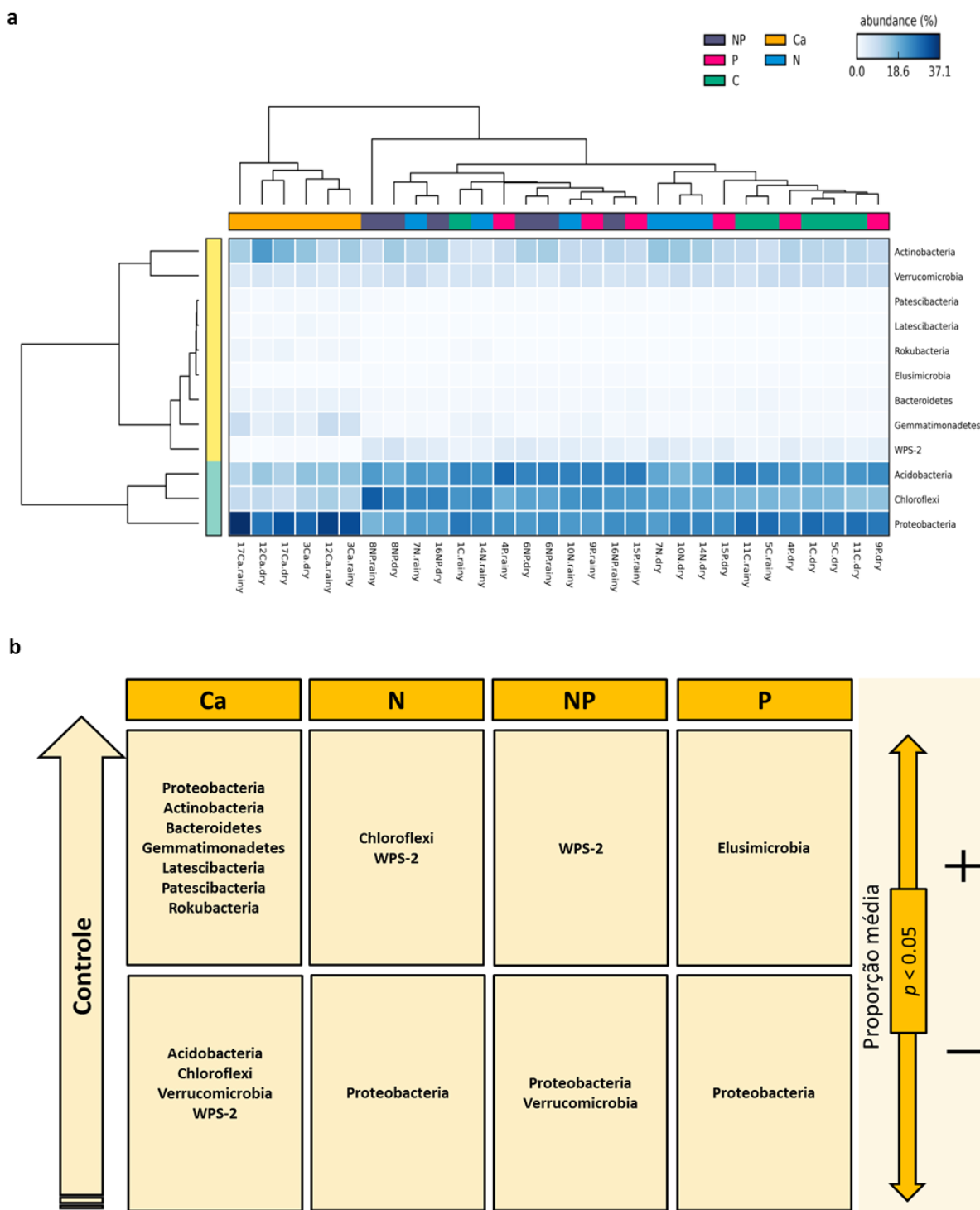


Fig. 9 Heatmap e dendrograma (UPGMA) dos filos bacterianos cuja abundância relativa diferiu entre os tratamentos de adição de nutrientes **(a)**. Resumo esquemático dos filos que aumentaram e/ou diminuíram sua proporção em cada tratamento em relação ao controle **(b)**. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Amostras das estações chuvosa (rainy) e seca (dry) de 2018. Parcelas representadas por números seguidos da inicial do tratamento e estação. Tratamentos: Controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). Maiores detalhes no Material Suplementar (Fig. S6).

Caracterização em nível taxonômico de família

Os três filos mais abundantes presentes nas amostras de solo dos tratamentos foram selecionados para caracterização em nível taxonômico de família. A abundância relativa de Proteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi estão descritas abaixo, para os níveis taxonômicos de classe, ordem e família. A descrição da abundância relativa dos grupos considerou cada classe isolada como equivalente a 100% e estão distribuídos entre elas os valores percentuais para cada ordem e família que compõem cada classe.

i. Proteobacteria

O filo Proteobacteria foi o mais abundante dentro da comunidade bacteriana do solo na área do experimento. Em geral, foram encontrados 3863 *taxa* afiliados a Proteobacteria distribuídos em três classes, 71 ordens, 122 famílias, 236 gêneros e 145 espécies anotados como *taxa* únicos. As classes dominantes foram Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, que compreenderam aproximadamente 43,6% e 45,2% do total da comunidade de Proteobacteria na estação chuvosa e 52,1% e 40,4% na estação seca, respectivamente. A classe Deltaproteobacteria representou aproximadamente de 10,1% da população de Proteobacteria na estação chuvosa e 7,5% na estação seca. Os dados são apresentados na Tabela 6.

Alphaproteobacteria

A ordem Rhizobiales foi a mais representativa dentro da classe Alphaproteobacteria em todos os tratamentos, incluindo o controle, e todas as estações. O grupo representou em média 68,8% das Alphaproteobacterias presentes, variando na proporção de 59,8% no tratamento NP a 72,2% no controle durante a estação chuvosa, enquanto na estação seca a variação ficou entre 62,3% no tratamento NP e 78,3% no controle. A família Xanthobacteraceae foi dominante entre as famílias afiliadas a Rhizobiales, com percentual médio de 54,3% na estação chuvosa e 55,4% na estação seca. Foi observada uma redução da sua abundância relativa no tratamento Ca de aproximadamente duas vezes em relação ao controle nas duas estações (controle vs. Ca: 65,7% vs. 34,5% na estação chuvosa e 69,4% vs. 35,8% na estação seca). Outras duas famílias dentro de Rhizobiales, Beijerinckiaceae e Hyphomicrobiaceae, apresentaram um padrão de redução e aumento, respectivamente, da sua abundância no tratamento Ca em relação aos demais tratamentos e controle. Enquanto Beijerinckiaceae diminuiu em aproximadamente duas vezes no tratamento Ca nas duas estações, Hyphomicrobiaceae aumentou aproximadamente 12 vezes neste tratamento durante a estação chuvosa e em seis vezes durante a estação seca, comparado ao controle. Outras famílias cuja abundância relativa foi reduzida no tratamento Ca, nas duas estações, foram Acetobacteraceae (ordem Acetobacterales), Caulobacteraceae (ordem Caulobacterales), grupos anotados como não cultiváveis pertencentes à ordem Elsterales e a família Micropepsaceae (ordem Micropepsales). Por outro lado, os grupos Dongiaceae (ordem Dongiales) e Hyphomonadaceae (ordem Caulobacterales) foram observados exclusivamente no tratamento Ca, com abundâncias relativa de 5,3% e 6,7%

durante a estação chuvosa e 4,8% e 5,9% durante a estação seca, respectivamente. O grupo não cultivável afiliado à ordem Elsterales apresentou abundância relativa aumentada nos tratamentos N e NP nas duas estações.

Gammaproteobacteria

A classe Gammaproteobacteria foi dominada pela ordem Gammaproteobacteria Incertae Sedis, que representou em média aproximadamente 62,1% do total da população de Gammaproteobacteria encontrada entre os tratamentos e estações. Nenhuma família foi caracterizada para esta ordem e de modo geral sua maior abundância relativa foi encontrada no tratamento N (74,6% na estação chuvosa e 74,1% na estação seca) enquanto sua menor abundância relativa foi observada no tratamento Ca (36,1% na estação chuvosa e 39,1% durante a seca). A ordem Betaproteobacteriales também foi encontrada com elevada abundância relativa dentro de Gammaproteobacteria. Dentro desta ordem, as famílias mais abundantes foram Burkholderiaceae e Nitrosomonadaceae. Burkholderiaceae apresentou maior abundância no controle durante a estação chuvosa (26,7%) e uma redução na sua abundância relativa no tratamento Ca (9,0% na estação chuvosa e 12,4% na estação seca) em relação aos demais tratamentos. Nitrosomonadaceae, ao contrário, apresentou elevado aumento da sua abundância relativa no tratamento Ca, representando 40,1% da comunidade de Betaproteobacteriales neste tratamento durante a estação chuvosa e 27,6% na seca, valores que indicam um aumento na abundância relativa de aproximadamente 18 vezes em relação ao controle na estação chuvosa e 23 vezes na estação seca. Outra família afiliada a Betaproteobacteriales, TRA3-20, foi exclusivamente observada no tratamento Ca. As ordens Diplorickettsiales e Xanthomonadales, também pertencentes à classe Gammaproteobacteria e inteiramente representadas pelas famílias Diplorickettsiaceae e Rhodanobacteraceae, respectivamente, foram observadas com maior abundância relativa no tratamento NP (2,9% e 3,2% na estação chuvosa e 3,2% e 2,9% na estação seca, respectivamente).

Deltaproteobacteria

A classe Deltaproteobacteria foi fortemente representada pela ordem Myxococcales, com 80,6% de abundância relativa, distribuída entre os diferentes tratamentos e estações, seguida da ordem Desulfarcuiales, com 7,2% de abundância relativa dentro da comunidade de Deltaproteobacterias. De modo geral, a ordem Myxococcales teve sua abundância reduzida no tratamento Ca em ambas as estações. Por outro lado, as famílias afiliadas a Myxococcales apresentaram variações nas suas abundâncias relativas no tratamento Ca. Polyangiaceae e Haliangiaceae foram as mais representativas. Enquanto Polyangiaceae teve sua abundância relativa bastante reduzida no tratamento Ca (controle vs. Ca: 45,5% vs. 8,2% durante a estação chuvosa e 41,3% vs. 10,0% na seca), Haliangiaceae foi a família mais representativa neste tratamento, que comparado ao controle, apresentou respectivamente uma abundância de 29,1% vs. 15,2% na estação chuvosa e 22,1% vs. 14,1% na

estação seca, respectivamente. Outras famílias afiliadas a Myxococcales, como Phaselicytidaceae, Sandaracinaceae e os grupos identificados como bacteriap25 e Blii41 também apresentaram maior abundância relativa no tratamento Ca, nas duas estações. A ordem Desulfarculales foi inteiramente representada pela família Desulfarculaceae e aparece quase exclusivamente no tratamento Ca, com abundância de 15,1% durante a estação chuvosa e 21,1% durante a estação seca, enquanto no controle e demais tratamentos sua abundância relativa foi igual ou menor que 0,1%.

Todas as classes afiliadas a Proteobacteria acima descritas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 Abundância relativa (%) das famílias e ordens pertencentes às classes afiliadas a **Proteobacteria** nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), Calagem (Ca), adição nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em "Outros".

| | Chuva | | | | | | Seca | | | | | | Média geral |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | C | Ca | N | NP | P | Média | C | Ca | N | NP | P | Média | |
| Alphaproteobacteria | | | | | | | | | | | | | 100 |
| Acetobacterales | 3.1 | 0.7 | 4.5 | 5.4 | 2.9 | 3.3 | 3.7 | 0.7 | 6.7 | 6.5 | 5.1 | 4.3 | 3.8 |
| Acetobacteraceae | 3.0 | 0.7 | 4.5 | 5.4 | 2.9 | 3.2 | 3.7 | 0.7 | 6.7 | 6.5 | 5.1 | 4.3 | 3.8 |
| Caulobacterales | 4.0 | 8.0 | 3.2 | 3.2 | 3.6 | 4.5 | 2.0 | 7.2 | 2.4 | 2.7 | 2.2 | 3.6 | 4.0 |
| Caulobacteraceae | 4.0 | 1.3 | 3.2 | 3.2 | 3.6 | 3.0 | 2.0 | 1.2 | 2.4 | 2.7 | 2.2 | 2.0 | 2.5 |
| Hyphomonadaceae | 0.0 | 6.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 5.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 1.5 |
| Dongiiales | 0.0 | 5.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.0 | 4.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 1.2 |
| Dongiaceae | 0.0 | 5.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.0 | 4.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 1.2 |
| Elsterales | 9.3 | 4.0 | 17.1 | 18.4 | 13.5 | 12.2 | 8.9 | 2.8 | 16.8 | 17.7 | 12.8 | 11.1 | 11.6 |
| uncultured | 7.8 | 3.7 | 16.7 | 18.0 | 13.0 | 11.5 | 8.5 | 2.7 | 16.3 | 17.0 | 12.4 | 10.7 | 11.1 |
| Micropepsales | 3.6 | 1.4 | 4.2 | 7.3 | 4.9 | 4.2 | 2.7 | 1.5 | 3.8 | 6.7 | 3.8 | 3.5 | 3.8 |
| Micropepsaceae | 3.6 | 1.4 | 4.2 | 7.3 | 4.9 | 4.2 | 2.7 | 1.5 | 3.8 | 6.7 | 3.8 | 3.5 | 3.8 |
| Reyranelles | 3.0 | 2.8 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 1.7 | 2.0 | 3.3 | 0.8 | 0.8 | 1.1 | 1.7 | 1.7 |
| Reyraneliaceae | 3.0 | 2.8 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 1.7 | 2.0 | 3.3 | 0.8 | 0.8 | 1.1 | 1.7 | 1.7 |
| Rhizobiales | 72.4 | 67.7 | 66.1 | 59.8 | 69.8 | 67.1 | 78.3 | 70.6 | 66.9 | 62.3 | 71.8 | 70.1 | 68.8 |
| Beijerinckiaceae | 3.7 | 1.5 | 4.1 | 3.1 | 3.6 | 3.1 | 4.8 | 2.2 | 4.0 | 3.5 | 5.4 | 3.8 | 3.5 |
| Hyphomicrobiaceae | 1.3 | 15.9 | 0.8 | 0.1 | 0.9 | 4.1 | 2.1 | 14.5 | 0.3 | 0.1 | 1.0 | 4.4 | 4.3 |
| KF-JG30-B3 | 0.0 | 2.2 | 1.1 | 2.3 | 0.9 | 1.3 | 0.0 | 1.3 | 0.6 | 1.0 | 0.2 | 0.7 | 1.0 |
| Rhizobiales Incertae Sedis | 0.8 | 4.3 | 1.1 | 1.0 | 1.2 | 1.7 | 0.8 | 4.5 | 1.2 | 1.3 | 1.0 | 1.9 | 1.8 |
| Xanthobacteraceae | 65.7 | 34.5 | 58.5 | 52.9 | 62.6 | 54.3 | 69.4 | 35.8 | 60.1 | 56.0 | 63.3 | 55.4 | 54.9 |
| Sphingomonadales | 0.9 | 3.9 | 1.5 | 2.5 | 1.9 | 2.2 | 0.6 | 4.4 | 1.2 | 1.0 | 1.3 | 1.9 | 2.0 |
| Sphingomonadaceae | 0.9 | 3.9 | 1.5 | 2.5 | 1.9 | 2.2 | 0.6 | 4.4 | 1.2 | 1.0 | 1.3 | 1.9 | 2.0 |
| Outros | 3.7 | 6.3 | 2.7 | 2.7 | 2.4 | 3.7 | 1.9 | 4.6 | 1.5 | 2.1 | 1.9 | 2.6 | 3.1 |
| Gammaproteobacteria | | | | | | | | | | | | | 100 |
| Betaproteobacteriales | 29.7 | 58.1 | 20.9 | 20.0 | 24.3 | 33.4 | 23.1 | 50.9 | 18.3 | 17.6 | 23.8 | 27.9 | 30.8 |
| Burkholderiaceae | 26.7 | 9.0 | 18.5 | 19.3 | 22.9 | 18.6 | 20.8 | 12.4 | 17.8 | 17.2 | 22.0 | 18.1 | 18.3 |
| Nitrosomonadaceae | 2.2 | 40.1 | 1.2 | 0.3 | 0.7 | 11.8 | 1.2 | 27.6 | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 6.7 | 9.3 |
| TRA3-20 | 0.0 | 6.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 9.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 1.9 |
| Diplorickettsiales | 0.5 | 0.6 | 0.9 | 2.9 | 1.3 | 1.1 | 0.8 | 0.8 | 1.8 | 3.2 | 1.6 | 1.5 | 1.3 |
| Diplorickettsiaceae | 0.5 | 0.6 | 0.9 | 2.9 | 1.3 | 1.1 | 0.8 | 0.8 | 1.8 | 3.2 | 1.6 | 1.5 | 1.3 |
| Gammaproteobacteria Incertae Sedis | 65.6 | 36.1 | 74.6 | 67.1 | 69.2 | 60.2 | 72.3 | 39.1 | 74.1 | 69.2 | 70.5 | 64.2 | 62.1 |
| Unknown Family | 65.6 | 36.1 | 74.6 | 67.1 | 69.2 | 60.2 | 72.3 | 39.1 | 74.1 | 69.2 | 70.5 | 64.2 | 62.1 |

| | Chuva | | | | | | Seca | | | | | | Média geral |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | C | Ca | N | NP | P | Média | C | Ca | N | NP | P | Média | |
| Xanthomonadales | 1.3 | 0.9 | 1.2 | 3.3 | 1.2 | 1.4 | 1.3 | 1.3 | 1.7 | 2.9 | 1.0 | 1.6 | 1.5 |
| Rhodanobacteraceae | 1.2 | 0.5 | 1.2 | 3.2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 | 0.7 | 1.7 | 2.9 | 1.0 | 1.4 | 1.3 |
| Outros | 2.99 | 4.34 | 2.49 | 6.67 | 4.07 | 3.95 | 2.43 | 7.82 | 4.06 | 7.08 | 3.05 | 4.79 | 4.36 |
| Deltaproteobacteria | 100 | | | | | | | | | | | | |
| Bdellovibrionales | 3.0 | 3.9 | 1.5 | 2.2 | 2.9 | 3.0 | 2.1 | 4.2 | 3.0 | 1.4 | 2.6 | 3.1 | 3.1 |
| Bdellovibrionaceae | 3.0 | 3.9 | 1.5 | 2.2 | 2.9 | 3.0 | 2.1 | 4.1 | 3.0 | 1.4 | 2.6 | 3.1 | 3.0 |
| Desulfarcales | 0.1 | 15.1 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 5.7 | 0.0 | 21.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.3 | 7.2 |
| Desulfarculaceae | 0.1 | 15.1 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 5.7 | 0.0 | 21.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 9.3 | 7.2 |
| Myxococcales | 90.1 | 72.2 | 91.2 | 87.9 | 89.0 | 83.1 | 91.3 | 63.2 | 83.1 | 89.9 | 85.4 | 77.2 | 80.6 |
| Archangiaceae | 6.1 | 1.0 | 9.8 | 2.8 | 2.7 | 3.7 | 5.8 | 1.6 | 3.2 | 2.2 | 0.8 | 2.5 | 3.2 |
| bacteriap25 | 0.2 | 8.2 | 0.6 | 0.1 | 0.2 | 3.2 | 0.2 | 10.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.4 | 3.7 |
| Blrii41 | 0.0 | 5.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.9 | 0.0 | 4.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 1.9 |
| Haliangiaceae | 15.2 | 29.1 | 21.8 | 19.0 | 20.2 | 22.6 | 14.1 | 22.1 | 11.0 | 17.6 | 18.6 | 18.3 | 20.9 |
| mle1-27 | 1.6 | 1.1 | 1.5 | 1.3 | 1.1 | 1.3 | 1.6 | 0.9 | 0.6 | 0.4 | 0.4 | 0.9 | 1.1 |
| P3OB-42 | 18.5 | 2.4 | 7.6 | 9.0 | 11.6 | 8.5 | 24.2 | 3.0 | 8.6 | 11.1 | 23.5 | 11.5 | 9.8 |
| Phaselicytidaceae | 0.4 | 3.6 | 0.2 | 0.0 | 0.6 | 1.5 | 0.6 | 1.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 1.3 |
| Polyangiaceae | 45.5 | 8.2 | 45.1 | 53.8 | 50.6 | 33.5 | 41.3 | 10.0 | 58.6 | 57.2 | 40.6 | 31.5 | 32.6 |
| Sandaracinaceae | 0.0 | 6.9 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 2.6 | 0.2 | 4.8 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 2.1 | 2.4 |
| uncultured | 1.7 | 3.6 | 4.2 | 0.4 | 0.4 | 2.4 | 1.8 | 2.2 | 0.2 | 0.4 | 0.0 | 1.4 | 2.0 |
| NB1-j | 0.8 | 2.5 | 0.2 | 0.0 | 0.1 | 1.1 | 1.6 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 2.0 | 1.5 |
| uncultured bacterium | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.0 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 1.1 |
| Oligoflexales | 3.8 | 3.2 | 4.3 | 4.4 | 2.9 | 3.6 | 1.8 | 2.0 | 4.6 | 3.7 | 3.0 | 2.6 | 3.2 |
| 0319-6G20 | 3.2 | 3.0 | 4.0 | 4.2 | 2.7 | 3.3 | 1.5 | 1.7 | 4.0 | 3.0 | 3.0 | 2.3 | 2.9 |
| RCP2-54 | 1.6 | 2.1 | 2.4 | 4.9 | 4.5 | 2.8 | 2.2 | 4.9 | 8.7 | 4.5 | 6.4 | 5.0 | 3.7 |
| uncultured bacterium | 1.3 | 0.2 | 2.4 | 3.8 | 4.0 | 1.8 | 1.6 | 0.5 | 6.0 | 4.5 | 5.9 | 2.6 | 2.1 |
| Outros | 0.57 | 1.10 | 0.38 | 0.74 | 0.57 | 0.77 | 0.94 | 1.04 | 0.63 | 0.46 | 0.96 | 0.89 | 0.82 |

ii. *Acidobacteria*

O filo Acidobacteria foi o segundo grupo com maior abundância relativa da comunidade bacteriana do solo. Em geral, foram encontrados 1105 taxa distribuídos em 16 classes, 33 ordens, 38 famílias, 58 gêneros e 46 espécies anotadas como grupos únicos. Considerando as subdivisões a partir do nível taxonômico de classe (100%), Acidobacteriia dominou entre todos os tratamentos e estações representando em média 87,5% do grupo Acidobacteria. Outra classe, Blastocatellia (Subgroup 4) também foi representativa entre os tratamentos e estações, com 7,4% de abundância relativa média, enquanto o Subgroup 6 e a classe Thermoanaerobaculia representaram 1,9% e 1% entre as classes afiliadas a Acidobacteria encontradas, respectivamente. As outras 12 subdivisões representaram juntas menos de 1,0% da população de Acidobacteria e não foram descritas. Os dados são apresentados na Tabela 7.

Acidobacteriia

Dentro da classe Acidobacteriia, as ordens mais representativas foram Acidobacteriales (51,8%), Solibacterales (13,4%) e o Subgroup 2 (34,3%). Acidobacteriales foi dominada por um grupo de Acidobacterias não cultiváveis e pelas famílias Acidobacteriaceae (Subgroup 1) e Koribacteraceae. Em relação ao controle, observou-se uma redução na abundância relativa de Acidobacteriaceae (Subgroup 1) no tratamento Ca, nas duas

estações (controle vs. Ca: 7,3% vs. 5,0% durante a estação chuvosa e 7,3% vs. 3,0% durante a estação seca) e um aumento desta família no tratamento NP (13,0% na estação chuvosa e 11,3% na estação seca). A família Koribacteraceae apresentou aumento na abundância relativa no tratamento Ca, nas duas estações (controle vs. Ca – 2,2% vs. 16,3% na estação chuvosa e 5,6% vs. 12,3% na estação seca). A ordem Solibacterales foi inteiramente representada pela família Solibacteraceae (Subgroup 3). Com exceção do controle, em geral foi observado um aumento na abundância relativa desta família em todos os tratamentos, da estação chuvosa para a estação seca (controle: 12,2% vs. 12,2; Ca: 10,4% vs. 22,9%; N: 9,0% vs. 16,0%; NP: 14,5% vs. 16,0%; P: 11,6% vs. 14,2%, respectivamente). O grupo indicado como Subgroup 2 foi composto por famílias indicadas como grupos de organismos “não cultiváveis”: uncultured Acidobacteria bacterium (23,9%), uncultured Holophaga sp. (7,7%) e uncultured soil bacterium (1,7%). De modo geral, uncultured Holophaga sp. e uncultured soil bacterium, tiveram sua abundância relativa reduzida no tratamento Ca, nas duas estações.

Blastocatellia (Subgroup 4)

A classe Blastocatellia (Subgroup 4) foi representada pelas linhagens 45597 e DS-100 e pelas ordens Blastocatellales e Pyrinomonadales. A ordem Pyrinomonadales foi a mais abundante da subdivisão Blastocatellia (Subgroup 4), com uma única família, Pyrinomonadaceae, particularmente mais abundante no tratamento de adição de N durante a estação chuvosa (controle vs. N: 50,9% vs. 87,4%) e com forte diminuição da sua abundância relativa da estação chuvosa para a estação seca no tratamento NP (61,7% vs. 9,9%, respectivamente). A linhagem 45597 foi representada por subgrupos indicados como “não cultiváveis” (uncultured Acidobacteria bacterium, uncultured Acidobacteriales bacterium e uncultured bacterium). Em geral, a abundância relativa da linhagem 45597 aumentou em todos os tratamentos e controle da estação chuvosa para a estação seca (controle: 43,1% vs. 61,6%; Ca: 11,9% vs. 29,8%; N: 11,5% vs. 74,2%; NP: 33,3% vs. 73,2%; P: 36,5% vs. 59,1%, respectivamente). A família Blastocatellaceae afiliada à ordem Blastocatellales apresentou maior abundância relativa no tratamento Ca em relação aos demais tratamentos e controle, nas duas estações (controle vs. Ca: 5,9% vs. 31,3% na estação chuvosa e 1,0% vs. 19,2% na estação seca).

Subgroup 6

A subdivisão Subgroup 6 foi representada por ordens descritas como uncultured Saccharibacillus sp., uncultured microorganism, uncultured Holophaga sp., uncultured bacterium 259, Acidobacteria bacterium SCN 69-37, uncultured subdivision 6, e grupos assinalados como ordem desconhecida ou não identificada (não descritos). Nenhuma ordem apresentou alguma família com nomenclatura definida. Resumidamente, uncultured Holophaga sp. apresentou um aumento da sua abundância relativa no tratamento NP nas duas estações e também da estação chuvosa para a estação seca no mesmo tratamento (controle vs. NP: 7,3% vs. 28,4% na estação chuvosa e 0,0% vs. 52,7% na estação seca). O grupo uncultured Saccharibacillus sp. foi

observado apenas no tratamento Ca, com elevada abundância relativa nas estações chuvosa e seca (26,4% e 24,6%, respectivamente).

Thermoanaerobaculia

A classe *Thermoanaerobaculia* apresentou uma única subdivisão em nível de ordem e família. A ordem *Thermoanaerobaculales* e a família *Thermoanaerobaculaceae* foram encontradas em todos os tratamentos, nas duas estações. Uma vez que o nível de classe foi considerado para inferir as abundâncias relativas e *Thermoanaerobaculia* só apresentou um representante, não foi possível inferir sobre diferenças na sua abundância relativa. As principais classes e subdivisões do filo *Acidobacteria* são apresentadas na Tabela 7.

iii. Chloroflexi

O filo *Chloroflexi* foi o terceiro mais abundante na área do experimento de adição de nutrientes. Foram ranqueadas 12 classes, 37 ordens, 42 famílias, 60 gêneros e 48 espécies como assinalados como *taxa* únicos. Entre as 12 classes encontradas para o filo, as mais representativas foram AD3 (46,1%), *Ktedonobacteria* (38,5%), TK10 (6,8%) e *Anaerolineae* (5,2%).

As outras classes menos representativas, com abundância relativa média inferior a 1% chamaram atenção pelo aumento no tratamento Ca em relação aos demais tratamentos e controle, sendo algumas delas encontradas exclusivamente neste tratamento. Por exemplo, *Chloroflexia* (controle vs. Ca: 0,3% vs. 4,5% na estação chuvosa e 0,3% vs. 7,5% na estação seca) e *Dehalococcoidia* (controle vs. Ca: 0,0% vs. 4,0% na estação chuvosa e 0,1% vs. 4,7% na estação seca) não foram incluídas pelo filtro da média geral, mas apresentaram proporções acima de 1% no tratamento Ca quando consideradas dentro do filo *Chloroflexi* em cada tratamento.

AD3

A divisão AD3 foi representada principalmente por ordens de organismos não cultiváveis como *uncultured Chloroflexi bacterium* (13,4%) e outros indicados apenas como “não cultiváveis”, cuja abundância relativa média chegou a 69,0% das ordens que compõem a classe. Não foram encontradas nomenclaturas validadas para o nível de família ou algum padrão que diferenciasse de forma clara a abundância desses grupos entre os tratamentos ou estações.

Ktedonobacteria

A classe *Ktedonobacteria* foi representada de forma abrangente pela ordem *Ktedonobacterales* (93,2%) cuja principal família foi *Ktedonobacteraceae* e a linhagem JG30-KF-AS9. Nas duas estações, a família *Ktedonobacteraceae* foi aproximadamente duas vezes menos abundante no tratamento Ca (controle vs. Ca: 90,6% vs. 45,2% durante a estação chuvosa e 87,3% vs. 52,7% na estação seca). A linhagem JG30-KF-AS9, ao

contrário, apresentou maior abundância relativa no tratamento Ca, especialmente durante a estação chuvosa (controle vs. Ca: 7,8% vs. 35,8% e 7,5% vs. 14,2% na estação seca). Ainda dentro da classe Ktedonobacteria, as linhagens B12-WMSP1 e C0119 sofreram mudanças na sua abundância relativa entre os tratamentos. Maior proporção da linhagem B12-WMSP1 foi encontrada no tratamento NP durante a estação chuvosa (7,1%) e nos tratamentos N (8,5%) e NP (7,8%) na estação seca, enquanto sua menor abundância foi observada no tratamento Ca, nas duas estações (0,1% durante a estação chuvosa e 1,2% na seca). Por outro lado, a linhagem C0119 apresentou grande aumento na sua abundância relativa no tratamento Ca (18,9% na estação chuvosa e 31,8% na estação seca).

TK10

Na divisão TK10 foram ranqueadas as subdivisões bacterium Ellin6519, bacterium Ellin6543 e organismos indicados como “não cultiváveis”. O grupo bacterium Ellin6519 teve sua abundância relativa expressivamente reduzida no tratamento Ca (controle vs. Ca: 70,0% vs. 29,0% na estação chuvosa e 67,9% vs. 14,7% na estação seca) e o mesmo padrão foi observado para o grupo bacterium Ellin6543 (controle vs. Ca: 15,3% vs. 4,1% na estação chuvosa e 15,3% vs. 5,8% na seca). Entre os não cultiváveis, uncultured bacterium, uncultured Chloroflexus sp. e uncultured Dehalococcoidia bacterium foram observados com maior abundância relativa no tratamento Ca, nas duas estações (Tabela 8).

Anaerolineae

A classe Anaerolineae foi principalmente representada pelas ordens Anaerolineales, Ardenticatenales, Caldilineales e pelas linhagens RBG-13-54-9 e SBR1031. A linhagem SBR1031 foi a mais abundante entre as classes afiliadas à Anaerolineae, e incluiu subdivisões denominadas A4b ou apenas como “não cultiváveis”. Em geral, enquanto a abundância de alguns grupos não cultiváveis foi reduzida no tratamento Ca, o grupo A4b foi encontrado predominantemente nos solos sob este tratamento (controle vs. Ca: 0,5% vs. 29,3% durante a estação chuvosa e 0,9% vs. 33,9% durante a estação seca). A ordem Anaerolineales incluiu a família Anaerolineaceae que, em geral, apresentou menor abundância no tratamento N, nas duas estações (C vs. N: 10,4% vs. 5,6% durante a estação chuvosa e 10,7% vs. 5,9% na estação seca). Outras ordens como Ardenticatenales e Caldilineales foram encontradas com abundância relativa acima de 1% dentro da classe Anaerolineae, mas apareceram exclusivamente no tratamento Ca, nas duas estações. Finalmente a linhagem RBG-13-54-9, apresentou de maneira geral, uma ligeira redução na sua abundância relativa da estação chuvosa (10,9%) para a estação seca (6,7%).

As principais classes e subdivisões do filo Chloroflexi são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 Abundância relativa (%) das famílias e ordens pertencentes às classes afiliadas a **Chloroflexi** nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), Calagem (Ca), adição nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP), adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância ≥ 1% na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em "Outros".

| | Chuva | | | | | | Seca | | | | | | Média geral |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | C | Ca | N | NP | P | Total | C | Ca | N | NP | P | Total | |
| AD3 | | | | | | | | | | | | | 100 |
| uncultured bacterium | 71.6 | 71.7 | 64.2 | 70.0 | 69.1 | 68.6 | 71.3 | 68.3 | 64.0 | 70.9 | 72.1 | 69.5 | 69.0 |
| uncultured bacterium | 71.6 | 71.7 | 64.2 | 70.0 | 69.1 | 68.6 | 71.3 | 68.3 | 64.0 | 70.9 | 72.1 | 69.5 | 69.0 |
| uncultured Chloroflexi bacterium | 13.0 | 9.8 | 13.0 | 11.2 | 13.9 | 12.5 | 14.2 | 12.8 | 15.5 | 13.7 | 15.5 | 14.5 | 13.4 |
| uncultured Chloroflexi bacterium | 13.0 | 9.8 | 13.0 | 11.2 | 13.9 | 12.5 | 14.2 | 12.8 | 15.5 | 13.7 | 15.5 | 14.5 | 13.4 |
| uncultured bacterium | 13.1 | 17.9 | 21.4 | 16.9 | 15.3 | 17.2 | 12.7 | 18.1 | 17.5 | 12.7 | 10.5 | 13.7 | 15.6 |
| uncultured bacterium | 13.1 | 17.9 | 21.4 | 16.9 | 15.3 | 17.2 | 12.7 | 18.1 | 17.5 | 12.7 | 10.5 | 13.7 | 15.6 |
| uncultured soil bacterium | 0.5 | 0.0 | 0.6 | 1.1 | 1.1 | 0.8 | 0.9 | 0.5 | 2.3 | 1.8 | 1.5 | 1.6 | 1.2 |
| uncultured soil bacterium | 0.5 | 0.0 | 0.6 | 1.1 | 1.1 | 0.8 | 0.9 | 0.5 | 2.3 | 1.8 | 1.5 | 1.6 | 1.2 |
| Outros | 1.9 | 0.6 | 0.9 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 0.8 | 0.4 | 0.8 | 0.9 | 0.3 | 0.7 | 0.8 |
| Ktedonobacteria | | | | | | | | | | | | | 100 |
| B12-WMSP1 | 1.3 | 0.1 | 4.0 | 7.1 | 3.7 | 3.9 | 4.6 | 1.2 | 8.5 | 7.8 | 4.9 | 6.4 | 5.2 |
| uncultured bacterium | 0.3 | 0.0 | 0.7 | 1.4 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.5 | 2.0 | 1.6 | 1.1 | 1.4 | 1.1 |
| uncultured Chloroflexi bacterium | 1.1 | 0.1 | 3.3 | 5.6 | 3.1 | 3.2 | 3.8 | 0.8 | 6.5 | 6.3 | 3.8 | 5.1 | 4.1 |
| C0119 | 0.1 | 18.9 | 0.3 | 0.4 | 0.7 | 1.0 | 0.3 | 31.8 | 0.1 | 0.2 | 0.6 | 2.0 | 1.5 |
| Ktedonobacterales | 98.5 | 81.0 | 95.5 | 92.4 | 95.5 | 95.0 | 95.0 | 67.0 | 91.4 | 91.9 | 94.4 | 91.5 | 93.2 |
| JG30-KF-AS9 | 7.8 | 35.8 | 6.7 | 7.6 | 7.4 | 8.3 | 7.5 | 14.2 | 5.6 | 5.3 | 5.9 | 6.5 | 7.4 |
| Ktedonobacteraceae | 90.6 | 45.2 | 88.7 | 84.7 | 88.0 | 86.6 | 87.3 | 52.7 | 85.5 | 86.5 | 88.4 | 84.9 | 85.7 |
| TK10 | | | | | | | | | | | | | 100 |
| bacterium Ellin6519 | 70.0 | 29.0 | 73.2 | 67.0 | 72.7 | 64.3 | 67.9 | 14.7 | 64.1 | 58.9 | 63.6 | 52.0 | 59.1 |
| bacterium Ellin6519 | 70.0 | 29.0 | 73.2 | 67.0 | 72.7 | 64.3 | 67.9 | 14.7 | 64.1 | 58.9 | 63.6 | 52.0 | 59.1 |
| bacterium Ellin6543 | 15.3 | 4.1 | 9.5 | 12.2 | 11.5 | 10.6 | 15.3 | 5.8 | 14.3 | 18.2 | 17.6 | 14.0 | 12.1 |
| bacterium Ellin6543 | 15.3 | 4.1 | 9.5 | 12.2 | 11.5 | 10.6 | 15.3 | 5.8 | 14.3 | 18.2 | 17.6 | 14.0 | 12.1 |
| uncultured bacterium | 1.6 | 20.9 | 3.8 | 7.5 | 2.8 | 6.8 | 3.2 | 22.2 | 5.5 | 9.3 | 3.8 | 9.6 | 8.0 |
| uncultured bacterium | 1.6 | 20.9 | 3.8 | 7.5 | 2.8 | 6.8 | 3.2 | 22.2 | 5.5 | 9.3 | 3.8 | 9.6 | 8.0 |
| uncultured Chloroflexus sp. | 0.5 | 24.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.8 | 0.0 | 36.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.5 | 5.8 |
| uncultured Chloroflexus sp. | 0.5 | 24.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.8 | 0.0 | 36.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.5 | 5.8 |
| uncultured Dehalococcoidia bacterium | 0.0 | 16.6 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 2.6 | 0.0 | 16.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.8 | 3.1 |
| uncultured Dehalococcoidia bacterium | 0.0 | 16.6 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 2.6 | 0.0 | 16.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.8 | 3.1 |
| Anaerolineae | | | | | | | | | | | | | 100 |
| Anaerolineales | 10.4 | 11.7 | 5.6 | 11.5 | 19.3 | 11.9 | 10.7 | 14.4 | 5.9 | 11.6 | 15.1 | 13.4 | 12.5 |
| Anaerolineaceae | 10.4 | 11.7 | 5.6 | 11.5 | 19.3 | 11.9 | 10.7 | 14.4 | 5.9 | 11.6 | 15.1 | 13.4 | 12.5 |
| Ardenticatenales | 0.0 | 3.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 4.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.1 | 2.6 |
| uncultured | 0.0 | 2.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 4.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.8 | 2.1 |
| Caldilineales | 0.0 | 3.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 6.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.5 | 3.0 |
| Caldilineaceae | 0.0 | 3.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 6.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.5 | 3.0 |
| RBG-13-54-9 | 7.2 | 13.0 | 5.9 | 13.6 | 7.6 | 10.9 | 8.7 | 6.0 | 6.1 | 9.3 | 7.3 | 6.7 | 9.0 |
| uncultured bacterium | 0.4 | 12.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.3 | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 5.0 |
| uncultured eubacterium | 6.8 | 0.0 | 5.9 | 13.6 | 7.3 | 3.0 | 8.7 | 0.2 | 6.1 | 9.3 | 7.3 | 2.8 | 2.9 |
| WCHB1-50 | | | | | | | | | | | | | |
| uncultured sludge bacterium | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.5 | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 1.0 |
| A31 | | | | | | | | | | | | | 100 |
| SBR1031 | 81.2 | 68.6 | 87.1 | 75.0 | 72.8 | 72.9 | 79.8 | 68.1 | 88.0 | 79.2 | 76.8 | 72.2 | 72.6 |
| A4b | 0.5 | 29.3 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 17.6 | 0.9 | 33.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 22.6 | 19.8 |
| uncultured bacterium | 24.9 | 11.9 | 47.0 | 30.4 | 25.7 | 19.5 | 33.8 | 15.4 | 23.6 | 40.2 | 36.9 | 21.7 | 20.5 |
| uncultured bacterium | 55.5 | 9.3 | 40.2 | 44.6 | 46.8 | 24.9 | 45.1 | 7.3 | 63.4 | 38.9 | 40.0 | 20.2 | 22.8 |
| uncultured soil bacterium | 0.2 | 17.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.5 | 0.0 | 9.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.4 | 8.7 |

α -diversidade

As medidas de α -diversidade diferiram entre os tratamentos de adição de nutrientes e entre as estações. Durante a estação chuvosa, o tratamento Ca apresentou maior riqueza comparado ao controle e demais tratamentos ($p < 0,05$). A diversidade medida pelo índice Shannon também foi maior no tratamento Ca em relação aos tratamentos N e P ($p < 0,05$), mas não houve diferença em relação ao NP ou ao controle ($p > 0,05$; Fig. 10). A riqueza e o índice de diversidade Shannon foram maiores no tratamento Ca em relação ao controle e demais tratamentos durante a estação seca ($p < 0,05$). Nesta estação, também foi observado maior índice de diversidade Shannon no tratamento NP em comparação com o tratamento P ($p < 0,05$; Fig. 10).

Cada tratamento foi plotado isoladamente nas duas estações a fim de verificar diferenças na diversidade associadas à sazonalidade (Fig. 11). Diferenças sazonais foram observadas apenas para os tratamentos Ca e N. Nestes dois tratamentos, a riqueza e o índice de diversidade Shannon foram maiores durante a estação seca ($p < 0,05$). Para os demais tratamentos e controle, não foram encontradas diferenças sazonais nas métricas de riqueza e diversidade ($p > 0,05$). Outras métricas de diversidade como “Observed OTUs”, “Chao1”, “ACE”, e “Fisher” sugerem os mesmos padrões de riqueza e diversidade já descritos e são mostradas na Fig. S7.

A avaliação da diversidade filogenética (Faith’s PD) resultou em um padrão semelhante àqueles das medidas não filogenéticas, com o tratamento Ca apresentando os maiores valores em relação ao controle e demais tratamentos, nas duas estações ($p < 0,05$; Fig. 12). Diferenças sazonais foram observadas somente no tratamento Ca ($p < 0,05$).

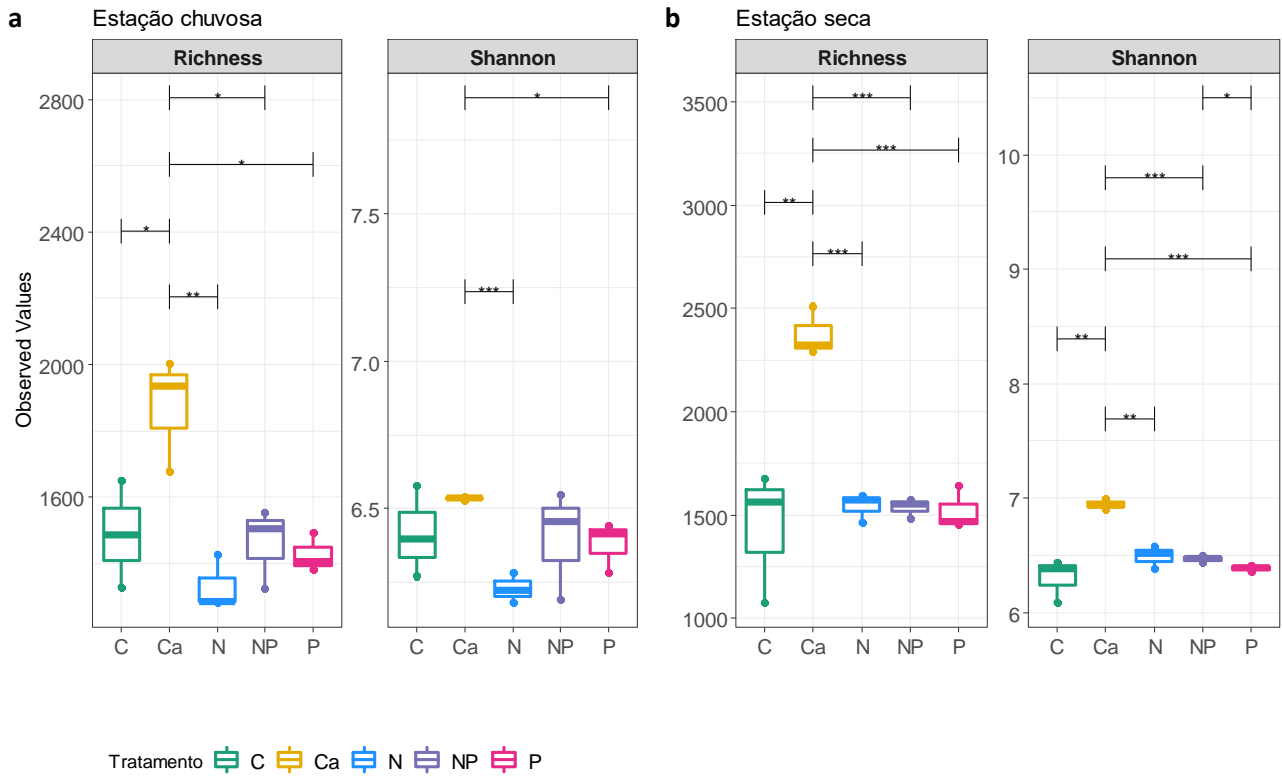


Fig. 10 Medidas de α -diversidade da comunidade bacteriana presente nos solos (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes, durante as estações chuvosa (**a**) e seca (**b**) de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças na comparação múltipla entre os tratamentos. ANOVA; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

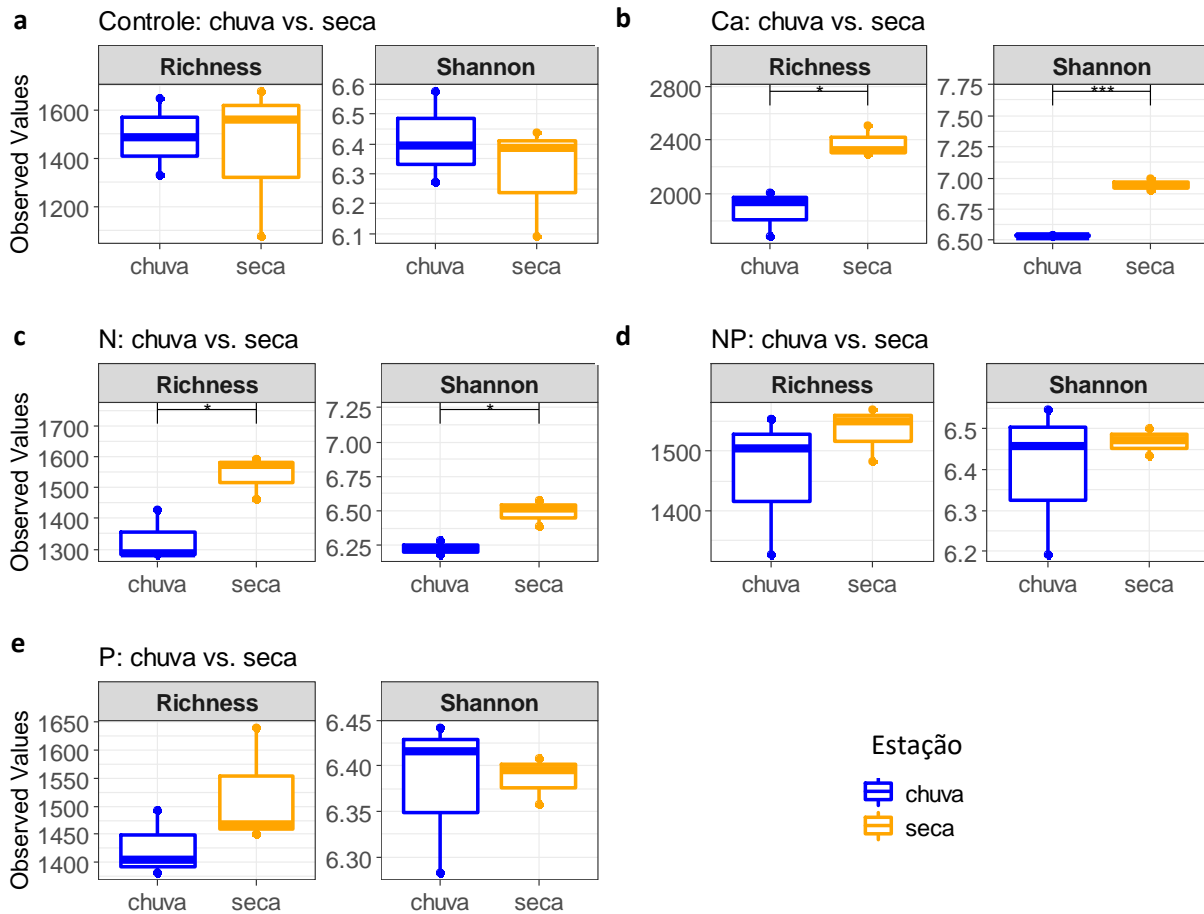


Fig. 11 Medidas de α -diversidade da comunidade bacteriana do solo (0-10 cm) associada às estações chuvosa vs. seca de 2018 nos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** Controle (C); **b)** calagem (Ca); **c)** adição de nitrogênio (N); **d)** adição de nitrogênio e fósforo (NP); **e)** adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças entre as estações para cada tratamento. ANOVA, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

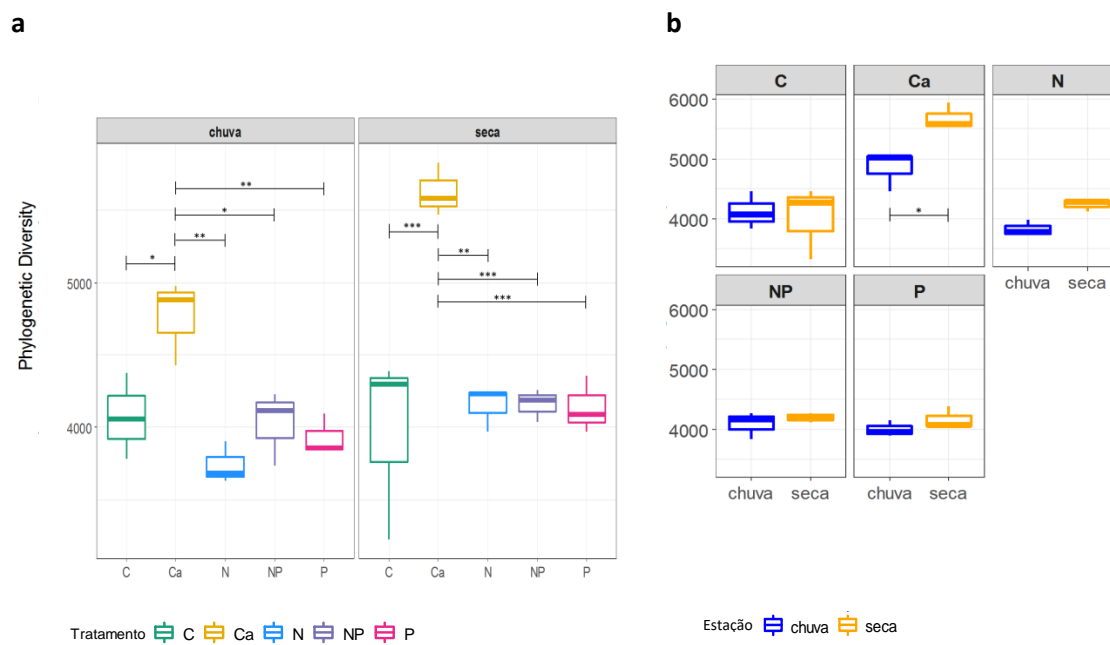


Fig. 12 Diversidade filogenética (Faith's PD) da comunidade bacteriana presente no solo (0-10 cm) dos tratamentos de adição de nutrientes durante as estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração em área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: Controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). As linhas associadas aos asteriscos indicam diferenças na comparação múltipla entre os tratamentos nas duas estações **(a)** e entre estações para cada tratamento **(b)**. ANOVA, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

β -diversidade

A PERMANOVA indicou diferenças na composição da comunidade bacteriana associada ao solo dos tratamentos do experimento de adição de nutrientes ($F = 11,31$; $R^2 = 0.62$; $p = 0.001$). Quatro clusters distintos foram observados a partir do gráfico PCoA baseado na distância UniFrac ponderada. Os eixos somaram uma explicação de 60,9% para a variação encontrada. A posição dos *plots* demonstra que os tratamentos Ca, NP, P e controle formaram grupos isolados. A disposição do tratamento com adição de N indicou que a composição da comunidade bacteriana é similar àquela encontrada no controle, NP e P. De modo geral, o tratamento Ca diferiu de todos os outros tratamentos, enquanto o tratamento P diferiu de NP e ficou mais próximo ao controle (Fig. 13). Outros diferentes métodos de ordenação baseados na medida de distância Bray-Curtis apontam para um padrão semelhante ao descrito anteriormente e podem ser consultadas na Fig. S8.

Algumas variáveis do solo e características da vegetação foram plotadas em uma análise canônica de coordenadas principais (CAP, baseada em RDA e distância Bray-Curtis). Os dois eixos explicaram 52,4% da variação nos dados. Os resultados indicam que o principal vetor associado às mudanças na composição da comunidade bacteriana do tratamento Ca foi o pH, seguido da presença de vegetação herbácea exótica. A

presença de vegetação herbácea nativa, o teor gravimétrico de água no solo e o conteúdo de N-NH_4^+ influenciaram as comunidades do controle e do tratamento P (PERMANOVA, $F = 5,83$; $p < 0,001$; Fig. 13b).

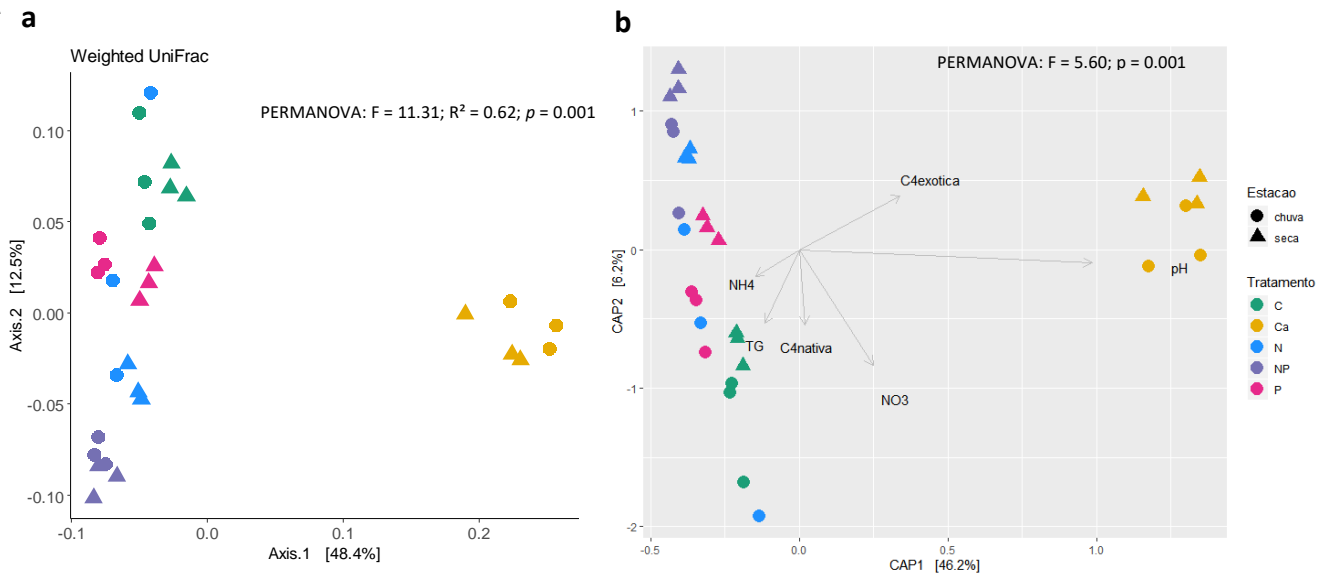


Fig. 13 Análise de ordenação das comunidades bacterianas associadas ao solo (0-10cm) de diferentes tratamentos de adição de nutrientes nas estações chuvosa e seca de 2018. **a)** Ordenação de Coordenadas Principais (PCoA) usando distância UniFrac ponderada. **b)** Análise Canônica de Coordenadas Principais com base em RDA (e distância Bray-Curtis) entre pares de amostras e sua relação com diferentes variáveis ambientais (edáficas – N-NO_3^- , N-NH_4^+ , TG – teor gravimétrico; e da vegetação – herbáceas C4 nativa e exótica). Área de cerrado típico, no experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

Valores de contribuição LCBD (*comparative indicators of the ecological uniqueness of the sites*) foram calculados para estimar a contribuição local de cada amostra para β -diversidade. O resultado indicou o grau de exclusividade de uma determinada amostra para a composição das famílias mais abundantes pertencentes aos filos Proteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi. O cálculo considerou as famílias relacionadas a todas as subdivisões (classe ou ordem) que compõem cada um dos filos. Para todos os grupos, maior contribuição local para a β -diversidade foi encontrada nas parcelas do tratamento Ca, que apresentaram os maiores valores LCDB tanto na estação chuvosa quanto na estação seca (Figs. 14, 15 e 16). A composição e a abundância de famílias afiliadas aos diferentes grupos nos demais tratamentos e controle foram mais similares entre si.

De modo geral, em Proteobacteria, os valores LCBD variaram entre 0,05 a 0,20 nas duas estações e as 10 principais famílias selecionadas e plotadas pelo coeficiente de dissimilaridade Hellinger foram Xanthobacteraceae, Burkholderiaceae, Nitrosomonadaceae, Polyangiaceae, Haliangiaceae, Micropepsaceae, Acetobacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Beijerinckiaceae e um grupo indicado como não cultivável.

Nitrosomonadaceae e Hyphomicrobiaceae apresentaram maior contribuição no tratamento Ca, nas duas estações. A família Haliangiaceae foi selecionada apenas na estação chuvosa enquanto a família Beijerinckiaceae foi selecionada apenas na estação seca (Fig. 14).

Em Acidobacteria, os valores LCBD variaram entre 0,05 a 0,25 durante a estação chuvosa e entre 0,1 a 0,3 na estação seca. Entre os grupos afiliados à Acidobacteria, Pyrinomonadaceae e Blastocatellaceae foram dominantes e exclusivas no tratamento Ca. Thermoanaerobaculaceae foi selecionada apenas na estação seca, com maior abundância em uma entre as três parcelas do tratamento Ca, embora apareça também nos demais tratamentos e controle com menor abundância relativa (Fig. 15).

Em Chloroflexi foram observados valores LCBD entre 0,1 a 0,2 durante a estação chuvosa e entre 0,1 a 0,3 na estação seca. A maioria dos grupos afiliados à Chloroflexi foram indicados como não cultiváveis. Entre as famílias com nomenclatura validada, Anaerolineaceae foi selecionada como parte das 10 famílias mais abundantes apenas na estação chuvosa enquanto na estação seca, foi substituída pelo grupo designado “uncultured candidate division SAM bacterium”, dominante em uma única parcela do tratamento Ca (Fig. 16).

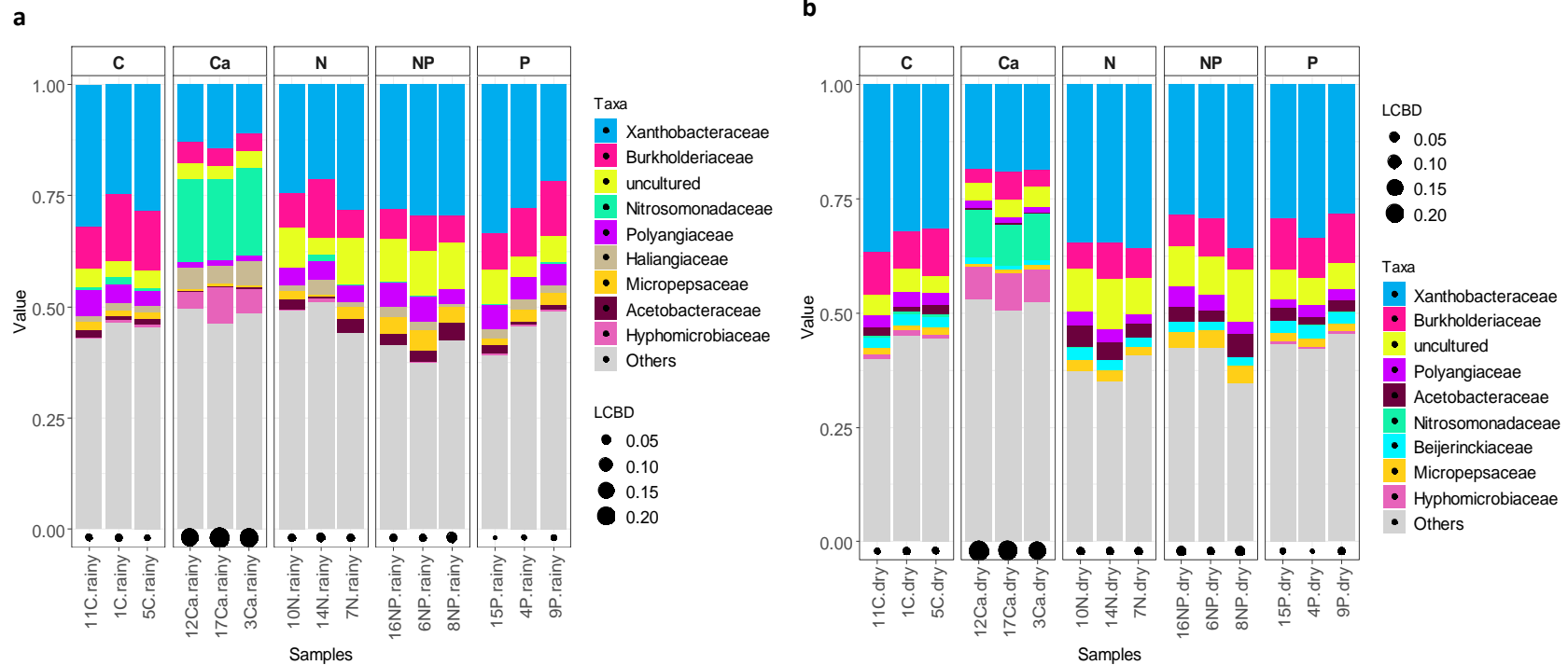


Fig. 14 Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Proteobacteria** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em “Others”. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

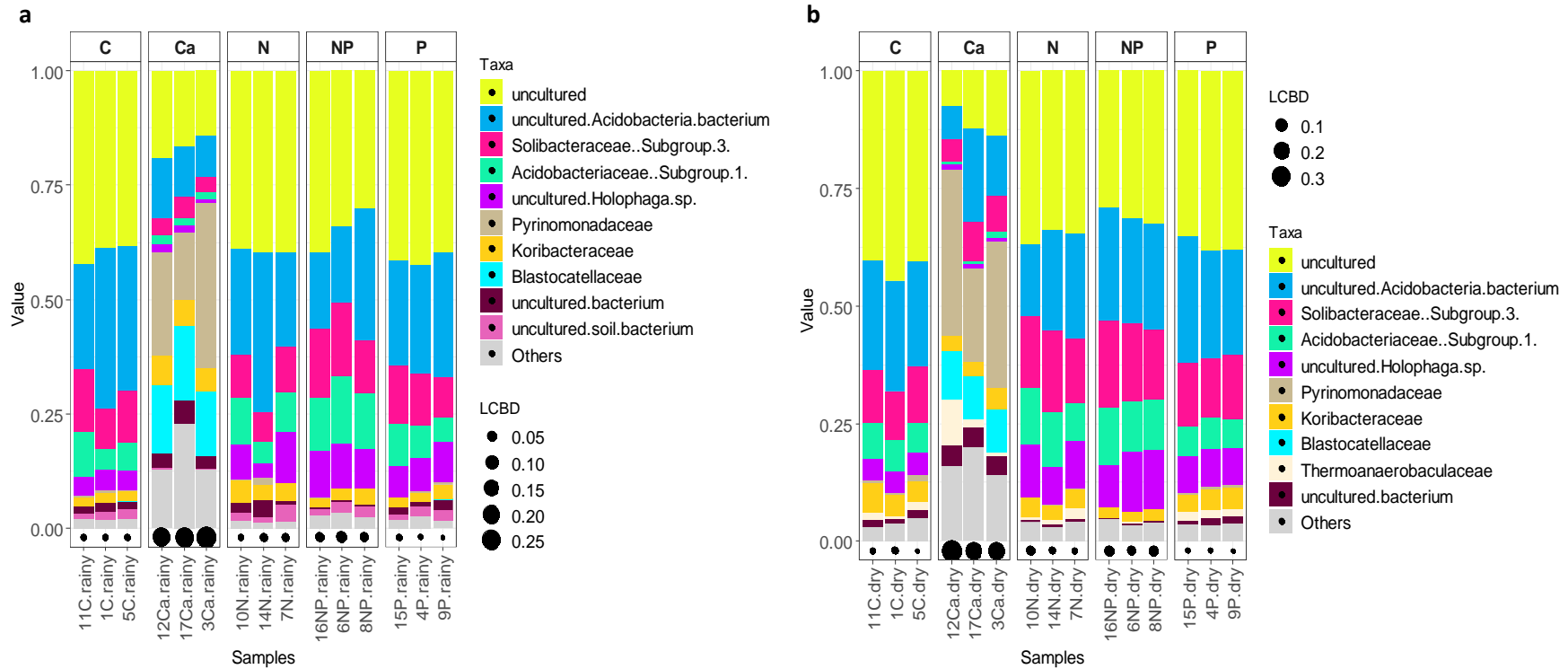


Fig. 15 Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Acidobacteria** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em “Others”. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

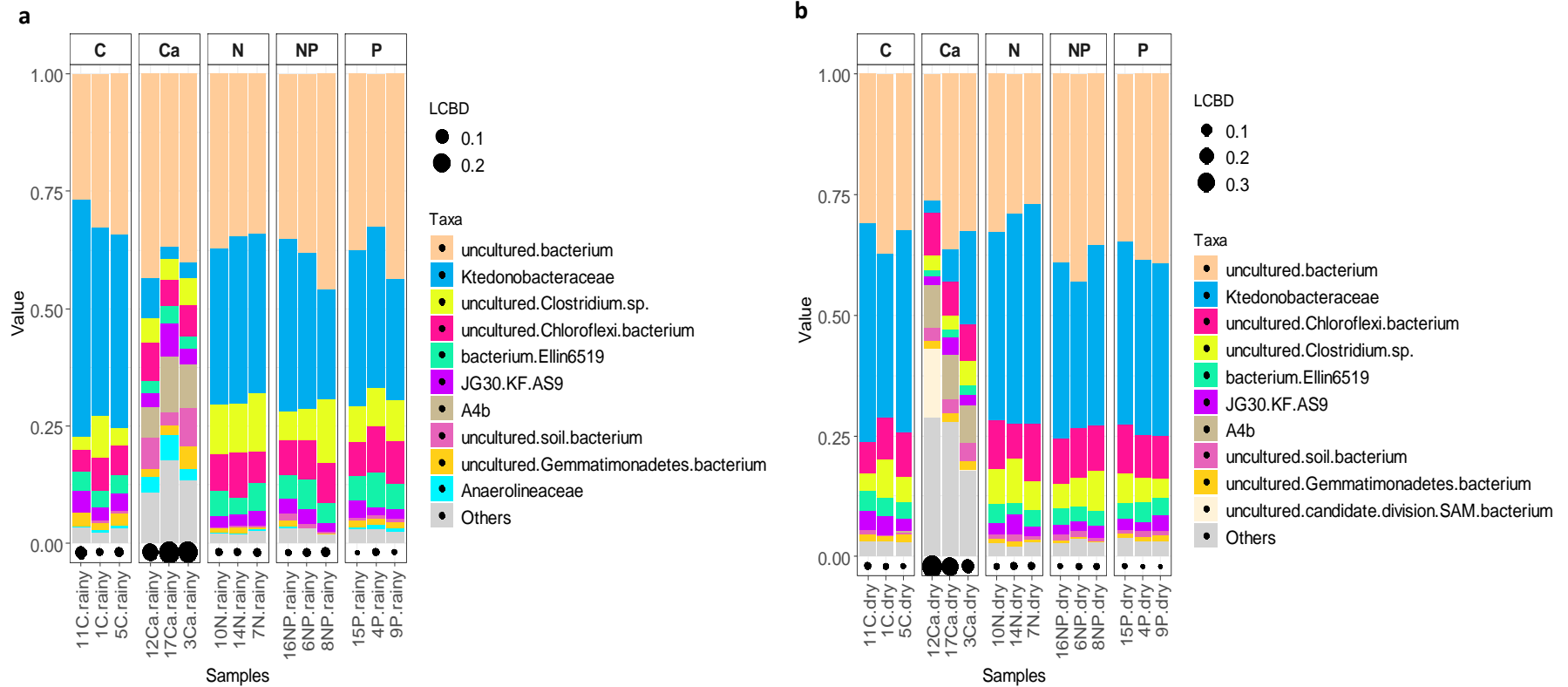


Fig. 16 Contribuição local para a β -diversidade entre os tratamentos de adição de nutrientes do experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. **a)** estação chuvosa e **b)** estação seca de 2018. Valores LCBD de cada amostra indicam o grau de exclusividade de uma amostra para a variação na composição de **Chloroflexi** ao nível de família. O tamanho dos pontos correspondem a magnitude do valor LCBD em cada amostra. As barras indicam os 10 grupos mais abundantes selecionados em cada parcela baseado no coeficiente de dissimilaridade Hellinger. Grupos com menor abundância estão agrupados em “Others”. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

Archaea

Foram encontrados 163 *taxa* distribuídos em cinco filos dentro da comunidade de Archaea (Fig. 17). O filo dominante entre os tratamentos foi Thaumarchaeota (83,56%), seguido dos filos Euryarchaeota (12,21%), Crenarchaeota (3,64%), Nanoarchaeaeota (0,53%) e Diapherotrites (0,07%). O filo Thaumarchaeota teve sua abundância reduzida no tratamento Ca e foi representado por sequências anotadas como Group 1.1c e pelas famílias Nitrososphaeraceae e Nitrosotaleacea. Os filos Nanoarchaeaeota e Diapherotrites apresentaram menor abundância e foram encontrados principalmente no tratamento Ca. Ao contrário, Euryarchaeota apresentou abundância aproximadamente quatro e 10 vezes maior no tratamento Ca durante a estação chuvosa e seca, respectivamente. O filo foi representado principalmente pela classe Thermoplasmata com sequências anotadas para Marine Group II, para a família Methanomethylophilaceae e outros grupos não cultiváveis. Por fim, o filo Crenarchaeota foi dominado pela classe Bathyarchaeia que apresentou abundância fortemente reduzida nos tratamentos NP e calagem em relação ao controle nas duas estações. Também foi observada uma redução na abundância do grupo da estação chuvosa para a estação seca em todos os tratamentos. A distribuição da frequência relativa dos grupos pertencentes à Archaea é apresentada na Tabela S1.

A riqueza e diversidade de Archaea apresentaram padrões distintos daqueles observados na comunidade bacteriana. A riqueza aumentou em todos os tratamentos em relação ao controle e a diversidade Shannon foi maior nos tratamentos N, NP e P, nas duas estações (Fig. 17). Sazonalmente a riqueza e diversidade apresentaram uma tendência de redução na estação seca, mas não houve diferenças significativas ($p > 0,05$; não mostrado).

A análise canônica de coordenadas principais (CAP, baseada em RDA e distância Bray-Curtis) indicou um padrão de distribuição da comunidade de Archaea muito semelhante àquele observado anteriormente para Bacteria. Os dois eixos explicaram 55,8% da variação nos dados. Os resultados indicaram novamente o pH como principal vetor associado às mudanças na composição da comunidade. O pH separou as amostras da calagem juntamente com a presença de vegetação herbácea exótica. A vegetação herbácea nativa separou especialmente a comunidade no controle, e o conteúdo de N-NH_4^+ influenciou amostras dos tratamentos P, NP e P (PERMANOVA, $F = 5,74$; $p < 0,001$; Fig. 17e).

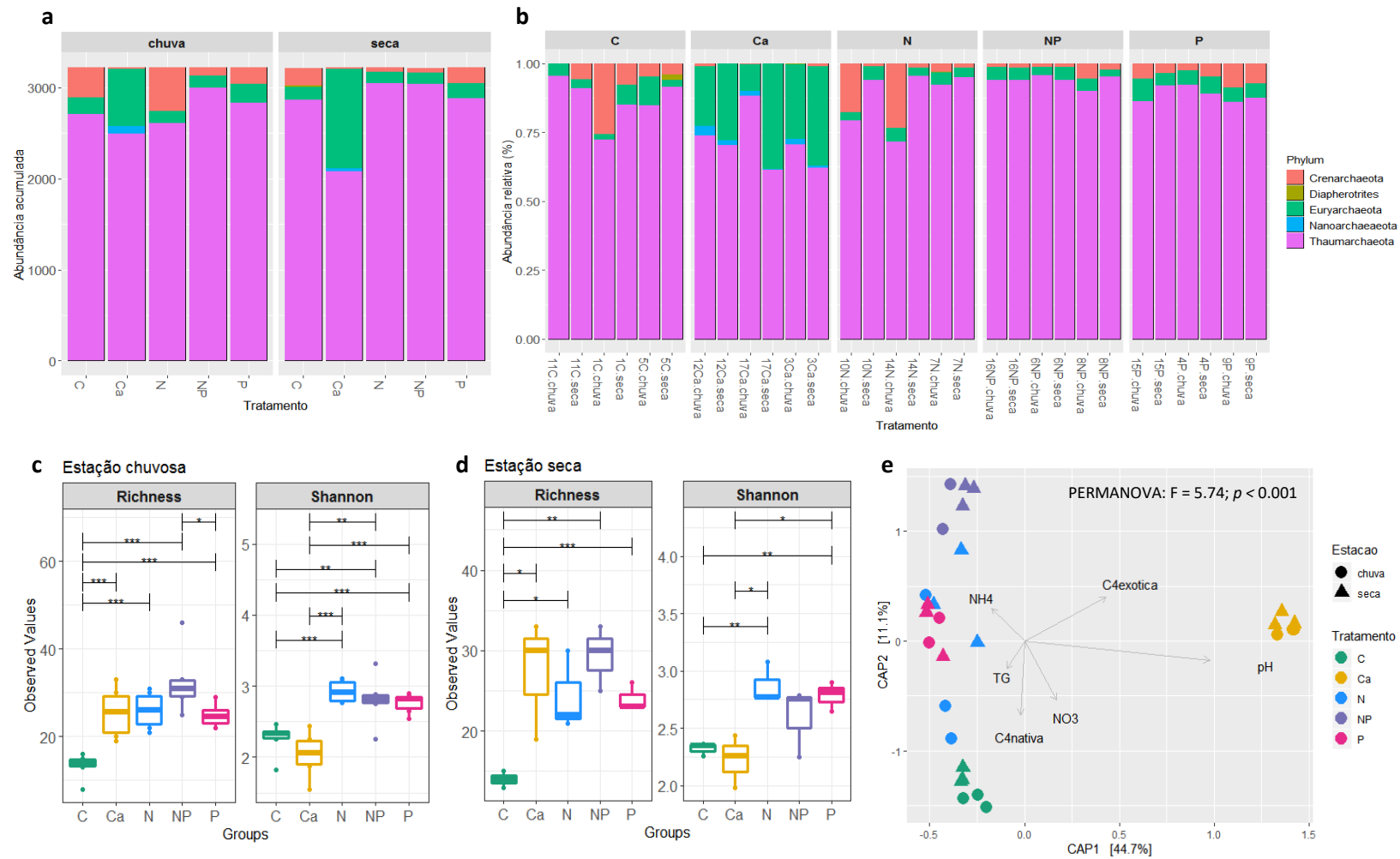


Fig. 17 Distribuição de Archaea em solos (0 – 10 cm) de cerrado submetidos à adição de nutrientes nas estações chuvosa e seca de 2018. **a)** abundância acumulada; **b)** abundância relativa; estimadores de riqueza e diversidade durante as estações chuvosa **(c)** e seca **(d)**; **e)** análise canônica de coordenadas principais com base em RDA (e distância Bray-Curtis) entre pares de amostras e sua relação com diferentes variáveis ambientais (edáficas – N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, TG – teor gravimétrico; e da vegetação – herbáceas C4 nativa e exótica). Área de cerrado típico, no experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

DISCUSSÃO

Alterações nos atributos químicos do solo

Várias linhas de evidências indicam que as alterações nas propriedades químicas do solo são importantes promotores de mudanças sobre processos ecológicos e sobre a vegetação (Haridasan 2008). Os efeitos dessas alterações já foram bem descritos na área de estudo (Garofalo 2001; Bustamante 2012; Mello 2019). Estes mesmos fatores podem ser determinantes sobre a composição e diversidade da microbiota associada ao solo (Piña and Cervantes 1996; Kunito et al. 2016). Em especial, o pH é considerado um importante preditor da estrutura da comunidade microbiana nos diferentes ecossistemas (Lammel et al., 2018; Tripathi et al., 2015, 2013; Wu et al., 2017).

As alterações no pH dos solos são frequentemente correlacionadas à outras mudanças nas propriedades edáficas (Fageria and Baligar, 2008). No tratamento Ca por exemplo, onde foram observadas as alterações mais marcantes, a redução no grau de acidez do solo em aproximadamente 20 vezes, promoveu o aumento nas concentrações de Ca^{2+} , Mg^{2+} , redução nos teores de K^+ e exclusão do Al^{3+} (Tabela 3 e 5). Por outro lado, nos tratamentos N, P e NP, o aumento da acidez em relação ao controle foi menos impactante sobre a limitação por nutrientes (Tabela 3 e 5). Embora a acidificação do solo possa provocar uma redução na disponibilidade de muitos nutrientes (Sousa and Lobato 2003), o aumento nas concentrações de P disponível nos tratamentos NP e P (Tabela 3 e 4) resultaram da aplicação de fosfato presente na composição química do fertilizante (Tabela 1).

Sazonalmente, o pH apresentou menores valores na estação seca (Tabela 5), o que pode ocorrer pela interação entre diferentes fatores cuja magnitude é difícil prever. Entre as possibilidades, a menor quantidade de água nos solos pela ausência dos eventos de precipitação pode ter favorecido a difusão de gases como oxigênio, que é consumido na respiração microbiana, deixando íons H^+ livres na solução do solo (Kirk, 2004). Em relação aos aspectos nutricionais, embora possa haver acumulação nos níveis de N inorgânico na superfície do solo durante a estação seca (Nardoto and Bustamante, 2003), nós observamos uma forte redução nos teores de N-NO_3^- e especialmente de NH_4^+ durante esse período (Tabela 5). Alguns autores sugerem que a redução nos níveis de N inorgânico durante o período de estiagem possa ocorrer por um aumento no requerimento de N pelas plantas, concomitante a um aumento da competição por nutrientes com os microrganismos no período chuvoso, o que causaria a redução desse nutrientes na estação seca (González-Pedraza and Dezzo, 2014). Dados pretéritos dos teores de N inorgânico nos solos das parcelas experimentais, entretanto, demonstraram menor variação sazonal nas concentrações de N-NO_3^- e NH_4^+ (Garofalo 2001; Silva 2012), sugerindo grande variabilidade na dinâmica do N reativo nestes solos.

Assim, a sazonalidade e as adições de nutrientes promoveram alterações pervasivas no pH e na disponibilidade de nutrientes entre as parcelas dos diferentes tratamentos da área experimental. A manutenção dessas alterações nos atributos químicos mesmo após 11 anos sem novas adições de nutrientes nos solos e sua menor variação após a retomada das adições são um forte indicativo de que o efeito residual

das fertilizações passadas foi mais determinante para as mudanças encontradas que os prováveis efeitos de curto prazo.

Alterações no perfil da comunidade microbiana

Nas comunidades de bactérias e arqueias, a separação entre os grupos de amostras do controle com os demais tratamentos, especialmente em relação ao tratamento Ca (Fig. 3 e 4), reforçam o entendimento do efeito residual das fertilizações passadas também sobre a composição e distribuição da comunidade microbiana. Esses resultados são consistentes com outros estudos que apontam mudanças na composição e abundância das comunidades microbianas associadas a solos submetidos à adição de nutrientes ao redor do mundo (Liu et al. 2015; Souza et al. 2016; Siebert et al. 2019). A separação entre os grupos de amostras nos diferentes períodos sazonais (Fig. S2 e S3) também sugere que a microbiota do solo é sensível à disponibilidade de água nos solos, corroborando estudos anteriores realizados em áreas naturais e antropizadas no Cerrado (Pereira de Castro et al. 2016; Silva et al. 2019).

Efeitos de longo prazo da adição de nutrientes sobre a abundância, riqueza e estrutura padrões de diversidade da microbiota

Em geral, os solos das parcelas foram dominados por Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e pelo filo Thaumarchaeota, pertencente à Archaea (Fig. 8 e 17a, b). Estudos genômicos comparativos já descreveram esses grupos como predominantes em solos de Cerrado, com alguma variação em sua abundância em resposta ao tipo de vegetação, sazonalidade da precipitação, regime de distúrbios associado à passagem de fogo e mudanças no uso da terra (Belmok et al., 2019; Catão et al., 2013; de Araujo et al., 2017; Pereira de Castro et al., 2016; Silva et al., 2019; Souza et al., 2016). A elevada abundância desses *taxa* em diferentes locais se dá pela sua característica mais generalista no uso dos recursos disponíveis (Elsas et al. 2019). Membros de Acidobacteria por exemplo, apresentam basicamente metabolismo do tipo K-estrategista, com alta diversidade, versatilidade e adaptabilidade às condições nutricionais nos solos (Elsas et al. 2019). Contudo, apesar da vasta distribuição e dominância destes grupos nos solos do bioma e nas parcelas dos diferentes tratamentos experimentais, nossos resultados mostraram diferenças na composição, abundância e diversidade destes e de outros filios com menor frequência (Fig. 8 a 17). Dentro dos três filios bacterianos dominantes, houve ainda alta variabilidade nas respostas entre as subdivisões taxonômicas de cada filo (Tabelas 6 a 8). Por exemplo, membros da classe Alphaproteobacteria, como Rhizobiales e Betaproteobacteriales conhecidos por atuar na ciclagem biogeoquímica do nitrogênio (Xun et al., 2018), foram encontrados em grande abundância entre os tratamentos experimentais, com alterações mais pontuais em nível de família (Tabela 6). Essas alterações foram observadas pelo grande aumento da abundância de Hyphomicrobiaceae e Nitrosomodaceae e forte redução de Xanthobacteraceae e Burkholderiaceae nos solos do tratamento Ca. Ainda em Alphaproteobacteria, a menor abundância da família Caulobacteraceae observada no tratamento Ca, pode ter sido influenciada pelo aumento do pH que causou

a exclusão do AI nos solos, elemento fortemente correlacionado com este grupo em solos Amazônicos (Lima et al., 2015). As implicações ecológicas da alteração de Caulobacteraceae em especial, poderiam resultar em uma menor atividade de degradação de componentes recalcitrantes como a lignina (Wilhelm et al., 2019) e quitina (Wieczorek et al., 2019). Por outro lado, Hyphomonadaceae e Dongiaceae, famílias pobremente descritas na literatura, representaram grupos encontrados exclusivamente no tratamento da calagem. Nos tratamentos N, NP e P, também observamos aumento na abundância de alguns grupos, tais como nas ordens Elsterales, Micropepsales e em membros de Acidobacteria, Acidibacteriaceae (Subgrupo 1) e uncultured Holophaga sp. (Tabela 6 e 7). Com menor abundância no tratamento da calagem, onde houve aumento na disponibilidade de determinados nutrientes, o filo Chloroflexi é geralmente descrito como um grupo de bactérias oligotróficas de crescimento lento (Rughöft et al., 2016). No entanto, vários membros de Chloroflexi tiveram aumento ou foram exclusivamente encontrados nas parcelas do tratamento Ca, como as ordens Ardenticatenales, Caldilineales, JG30-KF-AS9 entre outras (Tabela 8). Todo esse conjunto de resultados aponta para a elevada plasticidade e especificidade nas respostas entre os grupos de microrganismos dentro de uma mesma divisão. Essa variabilidade nas respostas de microrganismos dentro de um mesmo grupo filogenético vem sendo reportada em solos de outras savanas tropicais ou mesmo de outras regiões do mundo (Liu et al., 2015; Rughöft et al., 2016; Sridevi et al., 2012; Wang et al., 2016; Xue et al., 2010). Somado a essas observações, nossos resultados reforçam a necessidade de avaliações em uma resolução taxonômica mais fina para o entendimento dos efeitos pontuais das alterações nas propriedades do solo sobre a dinâmica do seu microbioma. Além disso, o conhecimento do comportamento da microbiota em resposta a essas mudanças, pode direcionar a avaliação da qualidade do solo e contribuir também com a sinalização dos seus potenciais efeitos sobre processos ecológicos mediados por esses grupos de microrganismos (Nottingham et al., 2018; Wu et al., 2019).

A alteração na abundância e riqueza de determinados grupos taxonômicos, refletiu sobre a diversidade e distribuição da comunidade microbiana entre os tratamentos experimentais (Figs. 8 a 17). Mais uma vez o tratamento com adição de calcário foi o que promoveu maiores efeitos sobre a diversidade de bactérias (Fig. 10), enquanto arqueias foram também afetadas pela adição de N, ou P ou N e P em conjunto (Fig. 17). A maior riqueza e diversidade bacteriana encontrada entre as parcelas Ca pode ter sido favorecida pelos efeitos interativos entre o aumento do pH e da disponibilidade de nutrientes promovidos pela adição de calcário. Por outro lado, a diversidade de arqueias foi reduzida neste tratamento e aumentou nos tratamentos N, NP e P, em que houve redução do pH. Como Archaea tem sido descrita para ter vantagem competitiva em ambientes ácidos e oligotróficos (Rughöft et al., 2016; Tripathi et al., 2015; Wu et al., 2017), estes mesmos eventos envolvendo alterações na disponibilidade de recursos e no pH podem ter sido suficientes para afetar negativamente a diversidade de Archaea em solos das parcelas sob calagem ou favorece-la nos demais tratamentos.

A estação seca parece favorecer a diversidade bacteriana, especialmente nos tratamentos N e Ca (Fig. 11), corroborando com estudos prévios que reportaram efeitos sazonais sobre a comunidade

microbiana no Cerrado (Pereira de Castro et al., 2016; Silva et al., 2019). Esta resposta pode estar associada a uma série de interações entre os componentes químicos, físicos e biológicos do solo. Embora seja por meio da água que íons e nutrientes são movidos entre as partículas que formam os agregados do solo (Elsas, et al. 2019) e chegam até os sítios de atividade microbiana, a ausência de chuva pode permitir maior difusão de gases entre estes agregados beneficiando metabolismos aeróbicos e a acumulação de alguns nutrientes que poderiam ser lixiviados pela percolação da água (Motta et al., 2002). Além disso, embora a redução na disponibilidade de água e na temperatura dos microambientes do solo possam reduzir a atividade microbiana ao longo dos ecossistemas no mundo (Espíndola et al., 2018; Liu et al., 2019; Schimel, 2018), os solos da nossa área de estudo não secam completamente durante a estação seca. Isso pode refletir na manutenção de condições de umidade ainda favoráveis para a captação de nutrientes pelos microrganismos e variações na temperatura do solo podem não ter sido tão severas a ponto de causar um impacto negativo sobre a diversidade. Por outro lado, estes resultados podem sugerir também que o cerrado detém grupos de microrganismos capazes de resistir ao estresse hídrico durante a estação seca, como Acidobacteria subgrupo 6 e Solibacteres, ambos membros do filo Acidobacteria (Pereira de Castro et al., 2016).

De acordo com os resultados obtidos através das avaliações de distribuição da comunidade microbiana entre os tratamentos e sua correlação com as variáveis ambientais e da vegetação (Fig. 13 e 17e), o pH é preditor primário das mudanças de longo prazo na microbiota associada ao solo dos tratamentos de adição de nutrientes. O pH separou principalmente as comunidades microbianas associadas ao tratamento Ca, juntamente com a presença da vegetação herbácea exótica de metabolismo C4, detectadas como invasoras (Mello, 2019). Isto pode ter ocasionado a maior diferenciação das comunidades de bactérias nos diferentes níveis taxonômicos neste tratamento e ainda justifica a maior contribuição local dos sítios associados a calagem para a β -diversidade (Figs. 14 a 16). Esses resultados estão de acordo com muitos estudos que apontam o pH como o fator mais determinante para a estrutura das comunidades microbianas no solo de muitos ecossistemas (Kielak et al., 2013; Lammel et al., 2018; Tripathi et al., 2015, 2013; Wu et al., 2017; Yun et al., 2016), embora outros vetores também sejam importantes e devem ser considerados. Por exemplo, em P as comunidades podem ter sido também ligeiramente influenciadas pelas concentrações de N-NH_4^+ enquanto nas parcelas do controle as comunidades parecem ter sido influenciadas pelo teor gravimétrico de umidade no solo e por gramíneas nativas (Figs. 13 e 17).

Nosso conjunto de resultados não suportam nossa hipótese de que a adição de nutrientes promove a redução na diversidade microbiana dos solos, uma vez que essa resposta não foi observada para nenhum dos dois domínios. Considerando que o pH controla a disponibilidade de nutrientes (Motta et al. 2002), afeta a dominância das espécies vegetais (Bustamante et al. 2006), promove inúmeras alterações no componente abaixo do solo (Tripathi et al. 2013), além de ser afetado pela sazonalidade da precipitação (Nardoto and Bustamante, 2003), as pervasivas mudanças nesse preditor em função da adição de nutrientes elucidam o papel crítico das alterações nas propriedades do solo sobre grupos de microrganismos que são mais ou menos tolerantes a essas variações. Embora os efeitos da variação sazonal mensuradas pelo teor

gravimétrico de umidade no solo também sejam importantes para determinação da abundância de alguns grupos e diversidade geral, seus efeitos foram menos pronunciados que aqueles promovidos pela redução na acidez do solo. Assim, os resultados obtidos destacam os consistentes impactos capazes de modificar substancialmente a microbiota indígena do solo e isso poderia ser suportado por outros estudos realizados em solos do Cerrado e da Amazônia (de Carvalho et al., 2016; Souza et al., 2016). Além disso, ponderando que mesmo após 11 anos sem novas adições de nutrientes, vários atributos químicos do solo permaneceram alterados na área experimental, poderíamos sugerir que nosso conjunto de dados representam indicadores preliminares de potencial alteração nas funções ecológicas mediadas pelas comunidades microbianas em solos submetidos a esse tipo de distúrbio.

REFERÊNCIAS

- Aislabie, J., Deslippe, J.R., Dymond, J.R., 2013. Soil microbes and their contribution to soil services, in: Dymond, J.R. (Ed.), *Ecosystem Services in New Zealand - Conditions and Trends*. Mannaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, pp. 143–161.
- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, J. L. de M. G., Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22:6, 711-728. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L., 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 75, 129–137. doi:10.3354/ame01753
- Araujo, J.F., Castro, A.P. De, Costa, M.M.C., Togawa, R.C., Handelsman, J., Krüger, R.H., 2012. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-012-0057-3
- Belmok, A., Rodrigues-Oliveira, T., Lopes, F.A.C., Miranda, H.S., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2019. Long-term effects of periodical fires on archaeal communities from Brazilian Cerrado soils. *Archaea* 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/6957210
- Bernhard, A., 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3, 25.
- Bond, W.J., Woodward, F.I., Midgley, G.F., 2004. The global distribution of ecosystems in a world without fire. *New Phytologist* 165, 525–538. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01252.x
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2647–53.
- Boyd, E.S., Peters, J.W., 2013. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00201
- Bresolin, J.D., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., Silva, M.R.S.S., Perez, K.S., 2010. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado.

Brazilian Journal of Microbiology 41, 391–403.

Brookshire, E.N.J., Wurzbarger, N., Currey, B., Menge, D.N.L., Oatham, M.P., Roberts, C., 2019. Symbiotic N fixation is sufficient to support net aboveground biomass accumulation in a humid tropical forest.

Scientific Reports 9, 7571. doi:10.1038/s41598-019-43962-5

Bucci, S.J., Scholz, F.G., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Campanello, P.I., Villalobos-Vega, R.,

Bustamante, M., Miralles-Wilhelm, F., 2006. Nutrient availability constrains the hydraulic architecture and water relations of savannah trees. *Plant, Cell and Environment* 29, 2153–2167.

doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01591.x

Bushnell, B., 2014. BBMap short read aligner. doi:DE-AC02-05CH11231

Bustamante, M.M.C., Medina, E., Asner, G.P., Nardoto, G.B., Garcia-Montiel, D.C., 2006. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79, 209–237. doi:10.1007/s10533-006-9006-x

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11, 2639–2643.

doi:10.1038/ismej.2017.119

Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G., 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle.

Science 330, 192–196.

Cardenas, E., Tiedje, J.M., 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current*

Opinion in Biotechnology 19, 544–549. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.010

Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I.,

Rodriguez-Valera, F., Pedros-Alio, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern.

Environmental Microbiology 4, 338–348. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x

Catão, E., Castro, A.P., Barreto, C.C., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2013. Diversity of Archaea in Brazilian

savanna soils. *Archives of Microbiology* 195, 507–512. doi:10.1007/s00203-013-0882-x

Catão, E., Lopes, F., Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., 2014. Diversity and Function of

Bacterial Assemblages in Savanna Vegetation Soils, in: Maheshwari, D. (Ed.), *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*. Springer, pp. 147–165.

doi:10.1007/978-3-319-05936-5_6

Catão, E.C.P., Lopes, F. a C., Araújo, J.F., de Castro, A.P., Barreto, C.C., Bustamante, M.M.C., Quirino, B.F.,

Krüger, R.H., 2014. Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. *International Journal of*

Microbiology 2014, 156341. doi:10.1155/2014/156341

Catão, E.C.P., Lopes, F.A.C., Rubini, M.R., Nardoto, G.B., Prosser, J.I., Krüger, R.H., 2016. Short-term impact of soybean management on ammonia oxidizers in a Brazilian savanna under restoration as revealed

by coupling different techniques. *Biology and Fertility of Soils* 52, 401–412. doi:10.1007/s00374-015-1086-0

- Catão, E.C.P., Thion, C., Krüger, R.H., Prosser, J.I., 2017. Ammonia oxidisers in a non-nitrifying Brazilian savanna soil. *FEMS Microbiology Ecology* 93, 1–8. doi:10.1093/femsec/fix122
- Chapin, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., 2011. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*, 2nd ed. Springer, New York.
- Chen, C., Zhang, J., Lu, M., Qin, C., Chen, Y., Yang, L., Huang, Q., Wang, J., Shen, Z., Shen, Q., 2016. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* 52, 455–467. doi:10.1007/s00374-016-1089-5
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O., Perakis, S.S., Latty, E.F., Von Fischer, J.C., Elseroad, A., Wasson, M.F., 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13, 623–645. doi:10.1029/1999GB900014
- Correa-Galeote, D., Tortosa, G., Bedmar, E.J., 2014. Microbial Nitrogen Cycle: Determination of Microbial Functional Activities and Related N-compounds in Environmental Samples, in: Marco, D. (Ed.), *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications*. Caister Academic Press, Argentina, pp. 175–193.
- Cuevas-Reyes, P., De Oliveira-Ker, F.T., Fernandes, G.W., Bustamante, M., 2011. Abundance of gall-inducing insect species in sclerophyllous savanna: understanding the importance of soil fertility using an experimental approach. *Journal of Tropical Ecology* 27, 631–640. doi:10.1017/S0266467411000368
- Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., Brözel, V.S., 2017. Diversity of free-living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological Research* 195, 31–39. doi:10.1016/j.micres.2016.11.004
- de Araujo, A.S.F., Bezerra, W.M., dos Santos, V.M., Rocha, S.M.B., Carvalho, N. da S., de Lyra, M. do C.C.P., Figueiredo, M. do V.B., de Almeida Lopes, Â.C., Melo, V.M.M., 2017. Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 110, 457–469. doi:10.1007/s10482-016-0815-1
- de Carvalho, T.S., Jesus, E. da C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M. de S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology* 97, 2760–2771. doi:10.1002/ecy.1513
- de Mello, T.R.B., Munhoz, C.B.R., Bustamante, M.M.C., 2014. Effects of nutrient additions on the diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado), in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Sheppard, L.J., Sverdrup, H., Haeuber, R., Hicks, W.K. (Eds.), *Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, pp. 147–154. doi:10.1007/978-94-007-7939-6_16
- Eiten, G., 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38, 201–341.

- Elsas et al. (ed) 2019. In: Elsas et al. *Modern soil microbiology*. 3 ed. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 9780429607929
- Embrapa, C.N. de P. de S., 1997. *Manual de métodos de análise de solo*, 2nd ed. Embrapa-CNPQ. Documentos,1, Rio de Janeiro.
- Espíndola, S.P., Bobuřská, L., Ferreira, A. de S., 2018. Impact of nitrogen additions on soil microbial respiration and temperature sensitivity in native and agricultural ecosystems in the Brazilian Cerrado. *Journal of Thermal Biology* 75, 120–127. doi:10.1016/j.jtherbio.2018.06.005
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., 2008. Ameliorating Soil Acidity of Tropical Oxisols by Liming For Sustainable Crop Production. pp. 345–399. doi:10.1016/S0065-2113(08)00407-0
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
- Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 340–373.
- Fernandes Cruvinel, Ê.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., Zepp, R.G., 2011. Soil emissions of NO, N₂O and CO₂ from croplands in the savanna region of central Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 29–40. doi:10.1016/j.agee.2011.07.016
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 357. doi:10.1073/pnas.0507535103
- Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Rütting, T., 2019. Evolution of nitrogen cycling in regrowing Amazonian rainforest. *Scientific Reports* 9, 8538. doi:10.1038/s41598-019-43963-4
- Foster, Z.S.L., Sharpton, T.J., Grünwald, N.J., 2017. Metacoder: an R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology* 13, e1005404. doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2017. The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance. *Microbial Ecology* 74, 701–708. doi:10.1007/s00248-017-0968-0
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042149
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology* 13, 1790–1799. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02488.x
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vasmataz, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- Garofalo, C.R., 2001. Efeitos do aumento da disponibilidade de nutrientes na dinâmica de nutrientes em plantas lenhosas e solo em uma área de Cerrado stricto sensu. Universidade de Brasília.

- González-Pedraza, A.F., Dezzeo, N., 2014. Effects of Land Use Change and Seasonality of Precipitation on Soil Nitrogen in a Dry Tropical Forest Area in the Western Llanos of Venezuela. *The Scientific World Journal* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/514204
- Graham, J.E., Wantland, N.B., Campbell, M., Klotz, M.G., 2011. Characterizing Bacterial Gene Expression in Nitrogen Cycle Metabolism with RT-qPCR 1 . Why Study Bacterial Transformation of Nitrogen is a key element of life and the competition for its acquisition, 1st ed, *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes Part B*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-386489-5.00014-2
- Gürtler, V., Stainisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16. doi:10.1099/13500872-142-1-3
- Han, L.-L., Wang, Q., Shen, J.-P., Di, H.J., Wang, J.-T., Wei, W.-X., Fang, Y.-T., Zhang, L.-M., He, J.-Z., 2019. Multiple factors drive the abundance and diversity of the diazotrophic community in typical farmland soils of China. *FEMS Microbiology Ecology* 95. doi:10.1093/femsec/fiz113
- Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20, 183–195. doi:10.1590/S1677-04202008000300003
- Hietz, P., Turner, B.L., Wanek, W., Richter, A., Nock, C.A., Wright, S.J., 2011. Long-Term Change in the Nitrogen Cycle of Tropical Forests. *Science* 334, 664–666. doi:10.1126/science.1211979
- Homeier, J., Báez, S., Hertel, D., Leuschner, C., 2017. Editorial: Tropical Forest Ecosystem Responses to Increasing Nutrient Availability. *Frontiers in Earth Science* 5. doi:10.3389/feart.2017.00027
- Huergo, L.F., Pedrosa, F.O., Muller-Santos, M., Chubatsu, L.S., Monteiro, R.A., Merrick, M., Souza, E.M., 2012. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. *Microbiology* 158, 176–190. doi:10.1099/mic.0.049783-0
- Hunke, P., Mueller, E.N., Schröder, B., Zeilhofer, P., 2015. The Brazilian Cerrado : assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use 1180, 1154–1180. doi:10.1002/eco.1573
- Isobe, K., Ohte, N., 2014. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* 29, 4–16. doi:10.1264/jsme2.ME13159
- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., 2019. Effects of nutrient addition on polyphenol and nutrient concentrations in leaves of woody species of a savanna woodland in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 35, 288–296. doi:10.1017/S0266467419000257
- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., 2011. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution* 159, 2236–2242. doi:10.1016/j.envpol.2010.10.019
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of

Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16.

doi:10.3389/fmicb.2016.00744

- Kielak, A.M., Cretoiu, M.S., Semenov, A. V., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2013. Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 263–272. doi:10.1128/AEM.02546-12
- Kirk, G. 2004. *The Biogeochemistry of Submerged Soils*. John Wiley & Sons, Chichester
- Klink, C. a., Machado, R.B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19, 707–713. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x
- Kozovits, A.R., Bustamante, M.M.C., Garofalo, C.R., Bucci, S., Franco, A.C., Goldstein, G., Meinzer, F.C., 2007. Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a neotropical savanna. *Functional Ecology* 21, 1034–1043. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01325.x
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil : Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.025
- Lammel, D.R., Barth, G., Ovaskainen, O., Cruz, L.M., Zanatta, J.A., Ryo, M., de Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2018. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. *Microbiome* 6, 106. doi:10.1186/s40168-018-0482-8
- Lannes, L.S., Bustamante, M.M.C., Edwards, P.J., Olde Venterink, H., 2016. Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. *Plant and Soil* 400, 231–243. doi:10.1007/s11104-015-2725-9
- Larson, C.A., Mirza, B., Rodrigues, J.L.M., Passy, S.I., 2018. Iron limitation effects on nitrogen-fixing organisms with possible implications for cyanobacterial blooms. *FEMS Microbiology Ecology* 94. doi:10.1093/femsec/fiy046
- Levy-Booth, D.J., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 11–25. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.021
- Lima, A.B., Cannavan, F. de S., Germano, M.G., Andreote, F.D., De, P.A.M., Franchini, J.C., Teixeira, W.G., Tsai, S.M., 2015. Effects of vegetation and seasonality on bacterial communities in Amazonian dark earth and adjacent soils. *African Journal of Microbiology Research* 9, 2119–2134. doi:10.5897/AJMR2015.7453
- Lima, J.E.F.W., Silva, E.M., 2008. Recursos hídricos do bioma Cerrado: importância e situação, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 90–106.
- Lin, Y., Ye, G., Liu, D., Ledgard, S., Luo, J., Fan, J., Yuan, J., Chen, Z., Ding, W., 2018. Long-term application of lime or pig manure rather than plant residues suppressed diazotroph abundance and diversity and altered community structure in an acidic Ultisol. *Soil Biology and Biochemistry* 123, 218–228. doi:10.1016/j.soilbio.2018.05.018

- Liu, D., Keiblinger, K.M., Leitner, S., Wegner, U., Zimmermann, M., Fuchs, S., Lassek, C., Riedel, K., Zechmeister-Boltenstern, S., 2019. Response of Microbial Communities and Their Metabolic Functions to Drying–Rewetting Stress in a Temperate Forest Soil. *Microorganisms* 7, 129. doi:10.3390/microorganisms7050129
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, W., Zhang, T., Chen, H., Mo, J., 2015. Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Scientific Reports* 5, 14378. doi:10.1038/srep14378
- Lynn, T.M., Liu, Q., Hu, Y., Yuan, H., Wu, X., Khai, A.A., Wu, J., Ge, T., 2017. Influence of land use on bacterial and archaeal diversity and community structures in three natural ecosystems and one agricultural soil. *Archives of Microbiology* 199, 711–721. doi:10.1007/s00203-017-1347-4
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Maron, P.A., Mougel, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus - Biologies* 334, 403–411. doi:10.1016/j.crv.2010.12.003
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* 17, 10. doi:10.14806/ej.17.1.200
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Medina, E., 1993. Mineral nutrition: tropical savannas, in: Behnke, H.D., Lüttge, U., Esser, K., Kadereit, J.W., Runge, M. (Eds.), *Progress in Botany / Fortschritte Der Botanik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 237–253. doi:10.1007/978-3-642-78020-2_12
- Meier, M., 1991. Nitratbestimmung in boden-proden (N-min-methode), Labor Praxis. Berlin.
- Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., La Roche, J., Geider, R.J., 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* 429, 292–294. doi:10.1038/nature02550
- Mirza, B.S., Potisap, C., Nüsslein, K., Bohannan, B.J.M., Rodriguesa, J.L.M., 2014. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the amazon rainforest. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 281–288. doi:10.1128/AEM.02362-13
- Motta, P.E.F., Curi, N., Franzmeier, D.P., 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado, in: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical*. Columbia University Press, New York, pp. 13–33.
- Moura, K.S.P. de, 2019. Utilização de nitrato por *Telmatobacter* sp. AB60 Acidobacteria. Universidade Católica de Brasília.
- Myers, N., Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, R. a, Fonseca, Gustavo a B, Fonseca, G a B, Kent, J., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–8. doi:10.1038/35002501

- Nardoto, G.B., Bustamante, M.M. da C., 2003. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 955–962. doi:10.1590/S0100-204X2003000800008
- Newton, W.E., 2007. Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation, in: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, William E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–129.
- Norman, J.S., Friesen, M.L., 2017. Complex N acquisition by soil diazotrophs: how the ability to release exoenzymes affects N fixation by terrestrial free-living diazotrophs. *The ISME Journal* 11, 315–326. doi:10.1038/ismej.2016.127
- Nottingham, A.T., Hicks, L.C., Ccahuana, A.J.Q., Salinas, N., Bååth, E., Meir, P., 2018. Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 54, 219–228. doi:10.1007/s00374-017-1247-4
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* 5, 787–797. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00476.x
- Oline, D.K., Schmidt, S.K., Grant, M.C., 2006. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. *Microbial Ecology* 52, 480–490. doi:10.1007/s00248-006-9101-5
- Oliveira-Filho, E.C. de, Lima, J.E.F.W., 2002. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado (No. 56), Documentos. Planaltina, DF. doi:ISSN: 1517-5111
- Oliveira, R.S., Bezerra, L., Davidson, E.A., Pinto, F., Klink, C.A., Nepstad, D.C., Moreira, A., 2005. Deep root function in soil water dynamics in cerrado savannas of central Brazil. *Functional Ecology* 19, 574–581. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01003.x
- Pajares, S., Bohannon, B.J.M., 2016. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–20. doi:10.3389/fmicb.2016.01045
- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* 18, 1403–1414. doi:10.1111/1462-2920.13023
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494
- Pearse, F., 2011. The Cerrado: Brazil's Other Biodiverse Region Loses Ground [WWW Document]. Yale School of Forestry & Environmental Studies.
- Pereira de Castro, A., Sartori da Silva, M.R.S., Quirino, B.F., da Cunha Bustamante, M.M., Krüger, R.H., 2016. Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLOS ONE* 11, e0148785. doi:10.1371/journal.pone.0148785
- Pereira e Silva, M.C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2013. Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS ONE* 8,

e74500. doi:10.1371/journal.pone.0074500

- Pinto, A. de S., 2002. Soil emissions of N₂O, NO, and CO₂ in Brazilian Savannas: Effects of vegetation type, seasonality, and prescribed fires. *Journal of Geophysical Research* 107, 8089. doi:10.1029/2001JD000342
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Monrozier, L.J., 2001. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2255–2262. doi:10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1641–1650. doi:10.1093/molbev/msp077
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35, 7188–7196. doi:10.1093/nar/gkm864
- Quirino, B.F., Pappas, G.J., Tagliaferro, A.C., Collevatti, R.G., Neto, E.L., da Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M.C., Krüger, R.H., 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research* 164, 59–70. doi:10.1016/j.micres.2006.12.001
- Rachid, C.T.C.C., Santos, A.L., Piccolo, M.C., Balieiro, F.C., Coutinho, H.L.C., Peixoto, R.S., Tiedje, J.M., Rosado, A.S., 2013. Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE* 8, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0059342
- Rampelotto, P.H., Ferreira, A. de S., Barboza, A.D.M., Roesch, L.F.W., 2013. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. *Microbial Ecology* 66, 593–607. doi:10.1007/s00248-013-0235-y
- Reatto, A., Correia, J.R., Spera, S.T., Martins, E.S., 2008. Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos, in: Sano, S.M., Almeida, S.P. de, Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 108–149.
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R., 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42, 489–512. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034
- Reed, S.C., Townsend, A.R., Cleveland, C.C., Nemergut, D.R., 2010. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia* 164, 521–531. doi:10.1007/s00442-010-1649-6
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 2008. As Principais fitofisionomias do bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 152–212.
- Rodrigues, T., Belmok, A., Catão, E., Kyaw, C.M., 2016. Archaea in Natural and Impacted Brazilian Environments. *Archaea* 2016, 1–14. doi:10.1155/2016/1259608
- Rosch, C., Mergel, A., Bothe, H., 2002. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid

- Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3818–3829. doi:10.1128/AEM.68.8.3818-3829.2002
- Rughöft, S., Herrmann, M., Lazar, C.S., Cesarz, S., Levick, S.R., Trumbore, S.E., Küsel, K., 2016. Community composition and abundance of bacterial, archaeal and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.01638
- Santos, H.G. dos, Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C. dos, Oliveira, V.A. de, Oliveira, J.B. de, COELHO, M.R., Lumberras, J.F., Cunha, T.J.F., 2006. Sistema brasileiro de classificação de solos, 2nd ed. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Sarmiento, G., Goldstein, G., Meinzer, F., 1985. ADAPTIVE STRATEGIES OF WOODY SPECIES IN NEOTROPICAL SAVANNAS. *Biological Reviews* 60, 315–355. doi:10.1111/j.1469-185X.1985.tb00420.x
- Schimel, J.P., 2018. Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49, 409–432. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062614
- Scholz, F.G., Bucci, S.J., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Miralles-Wilhelm, F., 2007. Removal of nutrient limitations by long-term fertilization decreases nocturnal water loss in savanna trees. *Tree Physiology* 27, 551–559. doi:10.1093/treephys/27.4.551
- Sequerra, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A., Moiroud, A., 1997. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycological Research* 101, 465–472. doi:10.1017/S0953756296002857
- Shridhar, B.S., 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiology Research* 3, 46–52. doi:10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103
- Silva, F.A.M., Assad, E.D., Evangelista, B.A., 2008. Caracterização Climática do Bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 70–88.
- Silva, M.R.S.S., 2012. Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas. Universidade de Brasília.
- Silva, M.R.S.S., Pereira de Castro, A., Krüger, R.H., Bustamante, M., 2019. Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management. *Acta Oecologica* 100, 103463. doi:10.1016/j.actao.2019.103463
- Simpson Junior, P.L.S., 2002. Crescimento e fenologia foliar de espécies lenhosas de uma área de cerrado sensu stricto submetida a fertilização. Universidade de Brasília.
- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L., Tiemann, L.K., 2019. To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 85. doi:10.1128/AEM.02546-18

- Souza, R.C., Mendes, I.C., Reis-Junior, F.B., Carvalho, F.M., Nogueira, M.A., Vasconcelos, A.T.R., Vicente, V.A., Hungria, M., 2016. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: how fragile is the Brazilian Cerrado? *BMC Microbiology* 16, 42. doi:10.1186/s12866-016-0657-z
- Spang, A., Caceres, E.F., Ettema, T.J.G., 2017. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 11, 357. doi:10.1126/science.aaf3883
- Sridevi, G., Minocha, R., Turlapati, S.A., Goldfarb, K.C., Brodie, E.L., Tisa, L.S., Minocha, S.C., 2012. Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 728–740. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01258.x
- Ssekagiri, A., Sloan, W.T., Ijaz, U.Z., 2017. microbiomeSeq: an R package for analysis of microbial communities in an environmental context, in: ISCB Africa ASBCB Conference on Bioinformatics. International Society for Computational Biology, Entebbe, Uganda, p. B-064. doi:10.13140/RG.2.2.17108.71047
- Staver, A.C., 2017. Prediction and scale in savanna ecosystems. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.14829
- Stein, L.Y., Klotz, M.G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26, R94–R98. doi:10.1016/j.cub.2015.12.021
- Supramaniam, Y., Chong, C.W., Silvaraj, S., Tan, I.K.P., 2016. Effect of short term variation in temperature and water content on the bacterial community in a tropical soil. *Applied Soil Ecology* 107, 279–289. doi:10.1016/j.apsoil.2016.07.003
- Swift, M.J., Andren, O., Brussaard, L., Briones, M., Couteaux, M.-M., Ekschmitt, K., Kjoller, A., Loiseau, P., Smith, P., 1998. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Global Change Biology* 4, 729–743. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00207.x
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews* 599–623. doi:10.1093/femsre/fux039
- Thompson, L.R., Sanders, J.G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K.J., Prill, R.J., Tripathi, A., Gibbons, S.M., Ackermann, G., Navas-Molina, J.A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J.T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., Haroon, M.F., Kanbar, J., Zhu, Q., Jin Song, S., Kosciulek, T., Bokulich, N.A., Lefler, J., Brislawn, C.J., Humphrey, G., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J.A., Clauset, A., Stevens, R.L., Shade, A., Pollard, K.S., Goodwin, K.D., Jansson, J.K., Gilbert, J.A., Knight, R., 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457–463. doi:10.1038/nature24621
- Tripathi, B.M., Kim, M., Lai-Hoe, A., Shukor, N.A.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2013. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 86, 303–311. doi:10.1111/1574-6941.12163
- Tripathi, B.M., Kim, M., Tateno, R., Kim, W., Wang, J., Lai-Hoe, A., Ab. Shukor, N.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2015. Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community

- structure. *Soil Biology and Biochemistry* 88, 1–8. doi:10.1016/j.soilbio.2015.05.004
- UNESCO, 2003. Subsídios ao zoneamento da APA Gama-Cabeça de Veado e Reserva da Biosfera do Cerrado : caracterização e conflitos socioambientais. Unesco, Brasil, MAB, Reserva da Biosfera, Brasília.
- van der Waal, C., de Kroon, H., de Boer, W.F., Heitkönig, I.M.A., Skidmore, A.K., de Knegt, H.J., van Langevelde, F., van Wieren, S.E., Grant, R.C., Page, B.R., Slotow, R., Kohi, E.M., Mwakiwa, E., Prins, H.H.T., 2009. Water and nutrients alter herbaceous competitive effects on tree seedlings in a semi-arid savanna. *Journal of Ecology* 97, 430–439. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01498.x
- Van Langenhove, L., Depaepe, T., Vicca, S., van den Berge, J., Stahl, C., Courtois, E., Weedon, J., Urbina, I., Grau, O., Asensio, D., Peñuelas, J., Boeckx, P., Richter, A., Van Der Straeten, D., Janssens, I.A., 2019. Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-019-04012-1
- Vanderleyden, J., Van Dommelen, A., Michiels, J., 2001. Fix Genes, in: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 707–709. doi:10.1006/rwgn.2001.1637
- Viana, L.T., Bustamante, M.M.D.C., Molina, M., Pinto, A.D.S., Kisselle, K., Zepp, R., Burke, R. a., 2011. Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. *Pesq. Agropec. Bras.* 46, 1665–1672.
- Vitousek, P., Howarth, R., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13. doi:10.1007/BF00002772
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I., 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57, 1–45.
- Wagner, S.C., 2011. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3, 15.
- Wang, Y., Ji, H., Gao, C., 2016. Differential responses of soil bacterial taxa to long-term P, N, and organic manure application. *Journal of Soils and Sediments* 16, 1046–1058. doi:10.1007/s11368-015-1320-2
- Wieczorek, A.S., Schmidt, O., Chatzinotas, A., von Bergen, M., Gorissen, A., Kolb, S., 2019. Ecological Functions of Agricultural Soil Bacteria and Microeukaryotes in Chitin Degradation: A Case Study. *Frontiers in Microbiology* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01293
- Wilhelm, R.C., Singh, R., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2019. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *The ISME Journal* 13, 413–429. doi:10.1038/s41396-018-0279-6
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wood, S.A., McGuire, K., Hickman, J.E., 2016. Microbial Communities and Processes under Climate and Land-use Change in the Tropics, in: Marxsen, J. (Ed.), *Climate Change and Microbial Ecology: Current*

Research and Future Trends. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 214.

- Wu, R., Cheng, X., Zhou, W., Han, H., 2019. Microbial regulation of soil carbon properties under nitrogen addition and plant inputs removal. *PeerJ* 7, e7343. doi:10.7717/peerj.7343
- Wu, Y., Zeng, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Lin, X., 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports* 7, 40093. doi:10.1038/srep40093
- Xue, D., Huang, X., Yao, H., Huang, C., 2010. Effect of lime application on microbial community in acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1253–1260. doi:10.1016/S1001-0742(09)60246-1
- Xun, W., Li, W., Huang, T., Ren, Y., Xiong, W., Miao, Y., Ran, W., Li, D., Shen, Q., Zhang, R., 2018. Long-term agronomic practices alter the composition of asymbiotic diazotrophic bacterial community and their nitrogen fixation genes in an acidic red soil. *Biology and Fertility of Soils* 54, 329–339. doi:10.1007/s00374-018-1264-y
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., Engel, A.S., 2016. The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implication for Soil Acidification. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01955
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., Steward, G.F., 2003. Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial community structure : a cross-system comparison 5, 539–554.
- Zhang, X., Liu, W., Schloter, M., Zhang, G., Chen, Q., Huang, J., Li, L., Elser, J.J., Han, X., 2013. Response of the Abundance of Key Soil Microbial Nitrogen-Cycling Genes to Multi-Factorial Global Changes. *PLoS ONE* 8, 2–11. doi:10.1371/journal.pone.0076500

Chapter 2 - Long-term liming promotes drastic changes in the composition of the microbial community in a tropical savanna soil

Authors:

Rafaella Silveira^{1,2,3}
Thiago de Roure Bandeira de Mello²
Maria Regina Silveira Sartori Silva²
Ricardo Henrique Krüger^{1,3}
Mercedes Maria da Cunha Bustamante^{1,2}

Corresponding author: rafaella_silveira@hotmail.com

Affiliations:

- ¹ Graduate Program in Microbial Biology, Cell Biology Department, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil
² Department of Ecology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil
³ Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

Authors' ORCID iD:

Rafaella Silveira: 0000-0003-4407-9374
Thiago de Roure Bandeira de Mello: 0000-0002-2373-9647
Maria Regina Silveira Sartori Silva: 0000.0003-2158-0078
Ricardo Henrique Krüger: 0000-0002-8443-9402
Mercedes Maria da Cunha Bustamante: 0000-0003-1008-452X

Funding information

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) through the Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Acknowledgments

The authors would like to thank the support of the IBGE Ecological Reserve team. We gratefully acknowledge Michelle Wong for her suggestions for this work. The authors have no conflict of interest to declare.

Published in the Journal "Biology and Fertility of Soils"

DOI: 10.1007/s00374-020-01504-6

ABSTRACT

We characterized soil bacterial and archaeal communities under native Cerrado vegetation and their responses to increases in soil pH. The experimental area was subjected to lime additions for eight consecutive years, followed by an 11-year interval and an additional lime application. We collected soil samples in the rainy and dry seasons of 2017 (representing the 11-year interval from the last liming) and 2018 (representing short-term effects, four and nine months after we resumed the liming). We studied the microbial communities of soil samples from control and treatment plots (liming) through 16S rRNA gene sequencing. We found that microbial community profiles differed by treatment and sampling period, suggesting long-term effects of liming and the strong influence of Cerrado's seasonal dynamics. Samples from liming treatment had a higher bacterial diversity than the control treatment, while the archaeal community showed the opposite response with lower diversity. Different from diversity estimators, enzyme-encoding genes for C, N, and S metabolic pathways showed a reduction in abundance in the liming treatment. The effects of liming on the soil microbial community under Cerrado vegetation are long-lasting. Despite the increase in diversity, the predicted functional profiles suggested a potential reduction on soil multifunctionality.

Keywords: Microbial diversity, microbial functional role, soil disturbance, nutrient enrichment, Cerrado biome.

INTRODUCTION

In the savannas of Central Brazil, a biodiversity hotspot (Myers et al. 2000), soils are predominantly nutrient-limited, well-drained, acidic, with low cation exchange capacity (CEC) and high aluminum contents (Lopes and Cox 1977; Haridasan 2008). Despite these limitations, in addition to the plant diversity (Eiten 1972; Furley 1999; Klink and Machado 2005; Haridasan 2008), the Cerrado harbors significant belowground diversity (Quirino et al. 2009; Pereira de Castro et al. 2016; de Araujo et al. 2017). Soil properties and the seasonal distribution of rainfall affect plant communities (Oliveira et al. 2005; Haridasan 2008; Bustamante et al. 2012). In 1998, we set up a fertilization experiment in a protected area to understand the role of nutrient availability and soil pH in the composition and functioning of a native Cerrado ecosystem (Kozovits et al. 2007; Jacobson et al. 2011; Jacobson and Bustamante 2019). Liming resulted in changes in soil chemical properties and the invasion by exotic grasses with adverse effects on the plant community's diversity and equitability (de Mello et al. 2014). The plant community changes were long-lasting, persisting after almost three and ten years without new nutrient or liming additions.

While studies have demonstrated the influence of liming on aboveground biota and some ecological processes, their effects on the soil microbial community are less understood in tropical soils under native vegetation. The soil microbial community plays a significant role in the primary biogeochemical cycles (Falkowski et al. 2008). They carry out crucial ecological functions through the production and release of a range of enzymes involved in C, N, P, S and other elements cycling across diverse terrestrial ecosystems,

being strongly influenced by vegetation type, edaphic and microclimatic properties (Nannipieri et al. 2003; Aislabie et al. 2013; Pajares and Bohannan 2016; Kaiser et al. 2016; Hariharan et al. 2017).

Recent descriptions of bacterial communities in Cerrado soils indicate the dominance of Proteobacteria and Acidobacteria, with some variations in the abundance of these two groups depending on plant composition, soil properties or rainfall seasonality (Rampelotto et al. 2013; Pereira de Castro et al. 2016; Souza et al. 2016; Silva et al. 2019). In other tropical ecosystems, previous studies indicated the N and P as the major limiting nutrients for belowground biota (Sugihara et al. 2015; Liu et al. 2015). Water availability in soils could influence the transport of these nutrients inside soil aggregates, affecting microbial abundance and diversity (Motta et al. 2002; Pereira de Castro et al. 2016). Also, in tropical soils, the acidity and high Al availability can limit other essential nutrients, such as Ca and Mg (Medina 1993). The conversion of Cerrado natural vegetation for agricultural use requires liming to increase soil pH and cation exchange capacity and reduce the availability of toxic elements like Al (Lopes and Cox 1977). There is a broad consensus that pH is the primary driver of microbial diversity and composition across the most diverse ecosystems worldwide (Xiong et al. 2012; Tripathi et al. 2015; Wu et al. 2017; Lammel et al. 2018). However, researchers have also found other potential predictors of microbial composition. In a microcosm experiment, researchers found that Mg and K are important controls of microbial density and functional distribution (Nicolitch et al. 2019). In a forest soil experiment, Ca was the primary control of the microbial taxonomic composition in forest soils (Sridevi et al. 2012). Therefore, the combined effects of nutrient availability, pH, and CEC and the water availability influenced by seasonality, could interact and drive shifts in the microbial community. Furthermore, the microbial response to these combined changes in soil properties could also alter microbial functional traits.

Although there is extensive literature recognizing the role of the soil microbial community in ecosystems, little is known about functional genes within these communities (Graham et al. 2016; Kaiser et al. 2016). The highly complex dynamics of the soil biology and its constant interaction with environmental factors hinder the assessment of soil microbiome multifunctionality, representing one of the biggest challenges for microbial ecology studies (Nannipieri et al. 2020). Furthermore, intrinsic limitations associated with marker genes or even in metagenomic studies are also challenging methodologically (Větrovský and Baldrian 2013; Fuentes-Pardo and Ruzzante 2017; Schöler et al. 2017). Several bioinformatic tools are available to predict microbial functioning in diverse ecosystems based on 16S rRNA gene sequence data. Despite their limitations and the fact that they cannot replace the metagenomic shotgun approaches, these methods may provide some initial insights about the functions of microbial communities (Aßhauer et al. 2015). In this context, they can be a first step to guide additional metagenomic research on more specific genes and function targets.

Understanding how liming affects bacterial and archaeal communities' composition, diversity, and potential functioning could improve our overall view of the possible interactive effects of nutrient limitation removal and seasonal variation on belowground communities. In this study, we investigated the effects of

long-term soil changes associated with liming on soil microbial community diversity and functionality and their interactions with the seasonal distribution of rainfall in the Cerrado by sampling in the rainy and in the dry season.

MATERIAL AND METHODS

Experimental area

This study was conducted in a long-term nutrient addition experiment (Kozovits et al. 2007), located at the Roncador Ecological Reserve (1,300 ha) of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (Reserva Ecológica do IBGE, Recor IBGE) (15°56'S, 47°53'W). The reserve is located in the Cerrado biome. The experiment was conducted in a savanna (typical cerrado), characterized by continuous herbaceous layer associated with a shrub-tree layer (Furley 1999; Haridasan 2008; Bustamante et al. 2012). The soil is classified as typic dystrophic Red Latosol, with a very clayey texture (LVdf - Oxisol) (Embrapa 2006). The climate is characterized as AW according to the Köppen classification, with a well-defined dry season (May to September) and a rainy season (October to April) when about 90% of the annual rainfall occurs (mean precipitation around 1,500 mm).

The fertilization experiment was initiated in 1998. The liming treatment comprised the annual application of 4 t/ha per year of 60% dolomitic limestone (CaO+MgO) + 40% agricultural gypsum (CaSO₄.2H₂O) until 2006 (Bustamante et al. 2012; de Mello et al. 2014). The addition was divided into two periods: the beginning and the end of the rainy season. Control and liming treatments consisted of four 15 x15 m plots each, randomly distributed with a minimum distance of 10 m between them. Each plot was subdivided into nine 5 x 5 m parcels to facilitate the application of lime. After 11 years without liming, the treatment was resumed in November 2017, applying 2t/ha of 60% dolomitic limestone (CaO+MgO) + 40% agricultural gypsum (CaSO₄.2H₂O).

Soil sampling and analyses

The soil samples (0-10 cm depth) were collected in the rainy and dry seasons of 2017 (April/September, respectively) and 2018 (March/August, respectively). The soil temperature at 0-10 cm was evaluated in situ using Digi-Sense® thermometer. Topsoil samples were randomly collected in five different parcels per plot to reduce the effect of soil heterogeneity. Subsequently, samples were pooled (avoiding roots) into a single composite and representative sample of each of the four plots per treatment. Subsamples for molecular analyses were immediately frozen in liquid nitrogen in the field and later stored at -80°C for analyses. Composite soil samples were sieved using a 2 mm mesh for the chemical analyses. The determination of the nutrient concentration was performed for soil samples collected during the rainy seasons of 2017 and 2018. Available P and K were extracted with Mehlich1 while Ca, Mg and Al were extracted with KCl 1M. Organic matter (OM) was determined by the Walkley-Black method. The analyses were performed following the Brazilian standard methods for soil analysis (Embrapa 1997). Total C (TC) and

N (TN) contents were determined by combustion of samples under continuous helium flow, in an elemental analyzer (Carlo Erba, CHN - 1110) coupled to the mass spectrometer Thermo Finnigan Delta Plus. After extraction of 2g soil with 25 mL of 1M KCl, the N-NO_3^- content was measured directly by UV-spectrophotometry (218 nm, 228 nm, 254 nm, and 280 nm) (Meier 1991), and the exchangeable N-NH_4^+ content by colorimetric reaction with the Nessler reagent at 425 nm. The pH values were determined in a solution using a 1:2.5 soil: water ratio. The soil moisture was determined by oven drying samples at 105°C to constant weight.

DNA extraction and sequencing

Nucleic acid extraction was performed for samples collected in 2017 and 2018 (from rainy and dry seasons). According to the manufacturer's protocol, the extraction was carried out in duplicates from 0.5 g (wet weight) of each soil sample through FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals). Genomic DNA (gDNA) was purified in an additional step by PowerClean® DNA Clean-Up kit (Mo Bio Laboratories, Inc). gDNA quality and quantity were measured in Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometra.

Three out of four gDNA samples from the control and liming for each season ($n = 12$) were sent for sequencing by Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea). The three samples were selected according to the similarity clusterization between replicates in the dendrograms of fingerprinting data generated using ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) (data not shown). The RISA Dendrograms were created in the Bionumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) based on the Dice coefficient and UPGMA method. Macrogen performed the 16S rRNA gene library preparation for sequencing. PCR reactions were carried out to target V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene using primers 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) and 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Apprill et al. 2015; Parada et al. 2016). The protocols for PCR reactions followed the indications of the Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/>). The amplicon sequencing was performed in a 2×300 bp paired-end Illumina MiSeq Next-Generation Sequencer, using Nextera XT Index Kit V2 and Herculase II Fusion DNA Polymerase enzyme.

Data processing

Data processing was performed using the QIIME 2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology 2, version 2019.4.0) pipeline (Bolyen et al. 2019). Briefly, 16SrRNA raw sequence FASTQ files were first evaluated for sequence quality on FastQC (Andrews 2010), and the adaptors sequences for Illumina MiSeq were removed using BBDuk default parameters (bbduk.sh) (Bushnell 2014). Paired-end sequences were imported into QIIME 2, and primers were trimmed from reads with cutadapt plugin (Martin 2011). Additional sequence control with denoising paired-end and chimera exclusion were carried out with DADA2 plugin (Callahan et al. 2017). DADA2 joins paired-end sequences and generates Amplicon Sequences Variants (ASV),

which have been described to outperform Operational Taxonomic Unit (OTU) clustering, resulting in more robust results (Callahan et al. 2017). Forward and reverse sequences were truncated for DADA2 analysis based on quality scores at positions 260 and 230, respectively. Sequences with a quality score lower than 20 and less than 150 bp were removed. The alignment was performed using MAFFT (Katoh and Standley 2013), and the phylogenetic tree was built with FastTree (Price et al. 2009). Taxonomies were assigned using the naïve Bayes classifier based on the SILVA (release 132) 99% identity OTU database (Pruesse et al. 2007). The taxa and ASV table outputs from QIIME 2 were used together with metadata as input files into R environment version 3.6.1 for statistical analysis. Before proceeding with statistical analyses, ASV assigned to non-target kingdoms, mitochondria, or chloroplasts were removed. Singletons and doubletons were also excluded from the dataset. To minimize spurious reads assignments from bioinformatic analysis and avoid misinterpretations, the bacterial dataset was further rigorously filtered to include only 14 phyla whose taxa (or ASV) account for a minimum of 2000 reads (cumulative, all samples). The archaeal dataset was filtered to remove unsigned reads.

Rarefaction curves of the ASV number were plotted against the number of sequences using the `ampvis2` package (Albertsen et al. 2015). Alpha (α) diversity metrics were estimated separately for bacteria and archaea from a standardized dataset by the median of sequence depth using `phyloseq` package in R (McMurdie and Holmes 2013). Richness was accessed by the Observed OTUs (based on observed sequence variants) and Chao1 estimators, and diversity was calculated by Shannon's index using the same package. A two-way ANOVA was performed to determine α -diversities differences ($p < 0.05$) between treatment and season. The Tukey's HSD test was performed for post-hoc comparisons. Overall relative abundances were calculated separately by domain as a percentage of the number of OTUs affiliated to each phylum and presented independently of the season. The abundance of phyla in the different treatments was compared by White's non-parametric t-test ($p < 0.05$) with Benjamini-Hochberg FDR correction on STAMP software (version 2.1.3) (Parks et al. 2014).

Bacterial phyla were categorized according to taxa abundance into dominant ($>10\%$), intermediary (between 1 and 10%), and rare taxa ($< 1\%$). We computed a hierarchical heat tree with taxonomic diversity, assessing taxa orders, families, and genera from the four dominant bacterial phyla. The heat tree with taxonomic diversity was generated based on the log 2 ratio of median proportions with the `metacoder` package in R (Foster et al. 2017). For Archaea, we limited descriptions at the phylum level.

Spearman correlations between microbial taxa and environmental variables were performed for bacterial and archaeal phyla using the `microbiomeSeq` package in R (Ssekagiri et al. 2018). Also, we run correlations for the most relevant taxa affiliated to different bacterial taxonomic levels.

Finally, functional predictions based on 16S rRNA gene data (including Bacteria and Archaea) were carried out using the `Tax4Fun` package in R (Aßhauer et al. 2015). `Tax4Fun` calculates the metabolic capabilities by linking amplicon taxonomy and abundance profile to a set of reference based on the database called KEGG Ortholog (KO) to predict potential microbial function profiles. Only genes within KEGG assigned

to C, N, P, and S cycles were analyzed. The Tax4Fun output (enzyme-encoding genes abundances and the respective metabolic pathways) was normalized by 16S rRNA copy number and used as an input file on STAMP (version 2.1.3) (Parks et al. 2014). First, we performed a PCA and a dendrogram clustering with the average neighbor (UPGMA) to view the distribution profile in multiple comparisons. Welch's t-test evaluated statistical differences ($p < 0.05$) between two groups with Bonferroni correction. Graphic representation was done to include only a standardized effect size > 2 .

Accession number: The sequences assessed in this study are available in NCBI Sequence Read Archive (Bioproject PRJNA647807).

Other statistical analyses

Shapiro-Wilk and Levene tests ($p > 0.05$) were used to examine data normality and homoscedasticity, respectively. Differences ($p < 0.05$) in environmental variables were tested by ANOVA in R. Tukey's honest significance test (Tukey's HSD) was employed for *post-hoc* comparisons. Soil variables were also evaluated by principal component analysis (PCA) in Past 3.10 (Hammer 2001). The environmental variables were included in the PCA, taking into account the significant results from previous ANOVA. Variables strongly correlated with each other were excluded from analysis, maintaining those with a higher correlation with the PCA first axis. Before PCA analyses, soil variables were transformed to have unit variance.

RESULTS

Long and short-term effects of liming on soil chemical properties

Differences in soil chemical properties between control and liming treatment evaluated in the rainy period of 2017 ($p < 0.05$) persisted even after 11 years without lime addition (Fig. 1a; Table S1). These differences included higher pH values (control: 4.55; liming: 5.92), available P (control: 0.53; liming: 1.30 mg/dm³), exchangeable Ca²⁺ (control: 0.12; liming: 5.57 cmlc/dm³) and Mg²⁺ (control: 0.12; liming: 5.57 cmlc/dm³) concentrations in the liming treatment plots ($p < 0.05$). On the other hand, OM (control: 7.08; liming: 5.82 dag/kg), K⁺ concentration (control: 30.00; liming: 11.33 mg/dm³), and especially Al³⁺ content (control: 1.20; liming: 0.00 cmlc/dm³) were higher in control than in liming treatment plots. Other variables such as N-NO₃⁻, and exchangeable N-NH₄⁺ concentrations, total inorganic N contents, as well as soil moisture and temperature did not differ between treatments ($p > 0.05$).

After four months (rainy season sampling in 2018) and nine months (dry season sampling in 2018) of the new addition of lime at the end of 2017 (Fig. 1b, Table S2), soil pH was higher in the liming treatment ($p < 0.05$) (control: 4.73 and 4.02; liming: 6.24 and 6.07, in the rainy and dry seasons, respectively). In the control plots, soil pH differs seasonally ($p < 0.05$). As observed in the sampling performed the new addition of lime, exchangeable Ca²⁺ (control: 0.21; liming: 4.62) and Mg²⁺ (control: 0.12; liming: 2.77), K⁺ (control: 31.97; liming: 10.67), and Al³⁺ (control: 0.97; liming: 0.00 cmlc/dm³) contents differed between treatments ($p <$

0.05). TC, TN contents and CN ratio did not differ between treatments ($p > 0.05$). Unexpectedly, available P (control: 1.77; Ca: 0.73 mg/dm³) was lower in liming treatment plots in comparison with control plots ($p < 0.05$).

Soil moisture (38.7% and 22.98%) and temperature (21.66°C vs. 18.62°C, at 0-10 cm depth) were significantly ($p < 0.05$) higher in the rainy season than in the dry season, respectively, but did not differ between treatments. Concentrations of N-NO₃⁻ did not vary between treatment or season ($p > 0.05$). Concentrations of exchangeable N-NH₄⁺ differed significantly between seasons ($p < 0.001$), with higher values in the rainy season (exchangeable N-NH₄⁺, rainy: 28.40; dry: 8.58; inorganic N, rainy 30.60; dry: 10.30, mg/kg; Table S2).

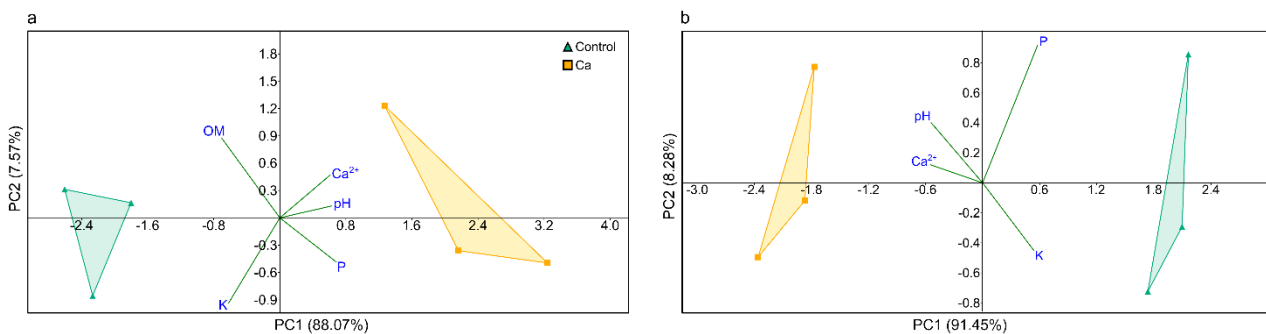


Fig. 1 Principal components analysis (PCA) ordination of standardized chemical parameters from composite topsoil samples (0-10 cm depth) of the control (C) and liming (Ca) plots in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. **a)** The rainy season of 2017, 11 years after the last lime addition; **b)** The rainy season of 2018, four months after liming.

The comparison of data before (2017) and after (2018) liming resumption indicated higher soil moisture in samples collected in 2018 (27.65% and 37.83% in the control plots and 23.41% to 38.30% in the liming plots, in 2017 and 2018, respectively). Soil pH and K⁺ content did not show differences between years, indicating the predominance of long-lasting effects of previous lime addition over the short-term effects of recent addition ($p < 0.05$; Table S3). Some significant, although small, changes were observed in samples from the two periods. The Ca²⁺ (0.12; 0.21 cmolc/dm³), Mg²⁺ (0.08; 0.12 cmolc/dm³) and available P (0.53; 1.77 mg/dm³) were higher in 2018 than in 2017. On the other hand, Ca²⁺ content (5.67; 4.62 cmolc/dm³) decreased in with liming in 2018. The N-NO₃⁻, exchangeable N-NH₄⁺ and inorganic N contents were higher in 2018 in both control and liming treatments ($p < 0.05$, Table S3).

Chemical properties of topsoil samples collected before and after the liming in 2017 were analyzed by PCA (Fig. 1), with axes accounting for 95.64% and 99.73% of the total variance, respectively, and a clear separation between the control and liming plots in both periods. Before the liming in 2017 (*i.e.*, 11 years after the last liming), the control and liming plots were separated by differences in pH and concentrations of Ca²⁺, available P, and OM, which showed correlation with PCA component 1 above 90%. After the new lime

addition (short-term effects), the control and liming plots were separated, especially by differences Ca^{2+} and K^+ contents, pH, and P availability, which showed correlation with PCA component 1 above 90% (Table S4).

Microbial community diversity

Bacteria and Archaea domains were recovered from 16S rRNA gene high-throughput sequencing on Illumina MiSeq. An ASV full dataset ($n=12$) with 956,005 and 14,297 good-quality sequences of Bacteria and Archaea, respectively, was analyzed and averaged approximately 80,858 sequences per sample (see Fig. S1 for details). The results corresponded to 14,644 bacterial taxa clustered into 14 phyla, 83 classes, 242 orders, 364 families, and 617 genera. The Archaea dataset resulted in 206 taxa clustered into five phyla, 11 classes, 21 orders, 18 families, and 23 genera. The rarefaction curves indicated that the sequencing effort was enough to describe most of the diversity in these soils samples (Fig. 2).

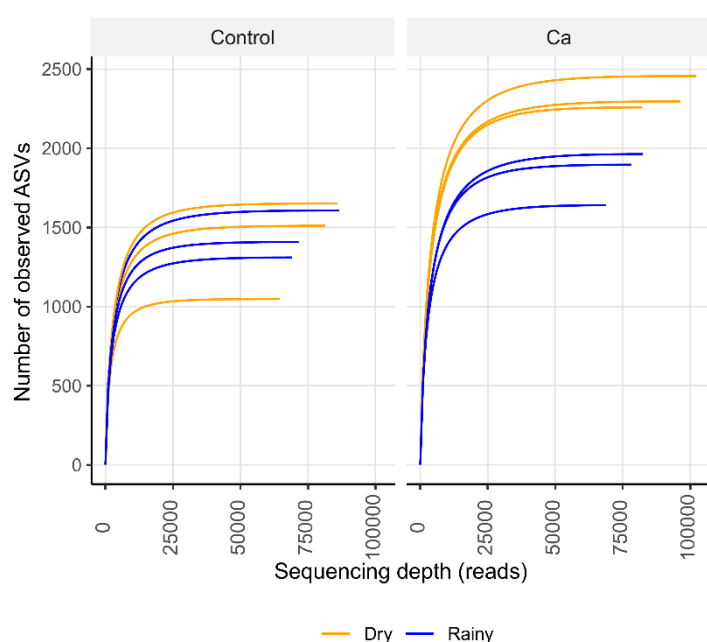


Fig. 2 Rarefaction curves of 16S rRNA sequencing depth and detected ASVs number in each soil sample (0-10 cm). Samples were collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil, where long-term fertilization experiment is located. Ca – liming plots.

Bacterial α -diversity (Fig. 3a; b) differed between control and liming plots only during the dry season when the liming treatment presented higher values for Observed OTUs, Chao1, and Shannon estimators ($p < 0.05$). Shannon index also showed seasonal differences for the liming treatment, with the highest value in the dry season ($p < 0.05$). For archaeal communities (Fig. 3c), α -diversity differed between treatments but not seasonally. The Observed OTUs and Chao1 indices were also higher in the liming treatment ($p < 0.05$), but the Shannon index showed an opposite response, with higher value in the control plots ($p < 0.05$). For bacterial and archaeal communities, the observed values for richness achieved the expected values showed by the Chao1 index (Fig. 3).

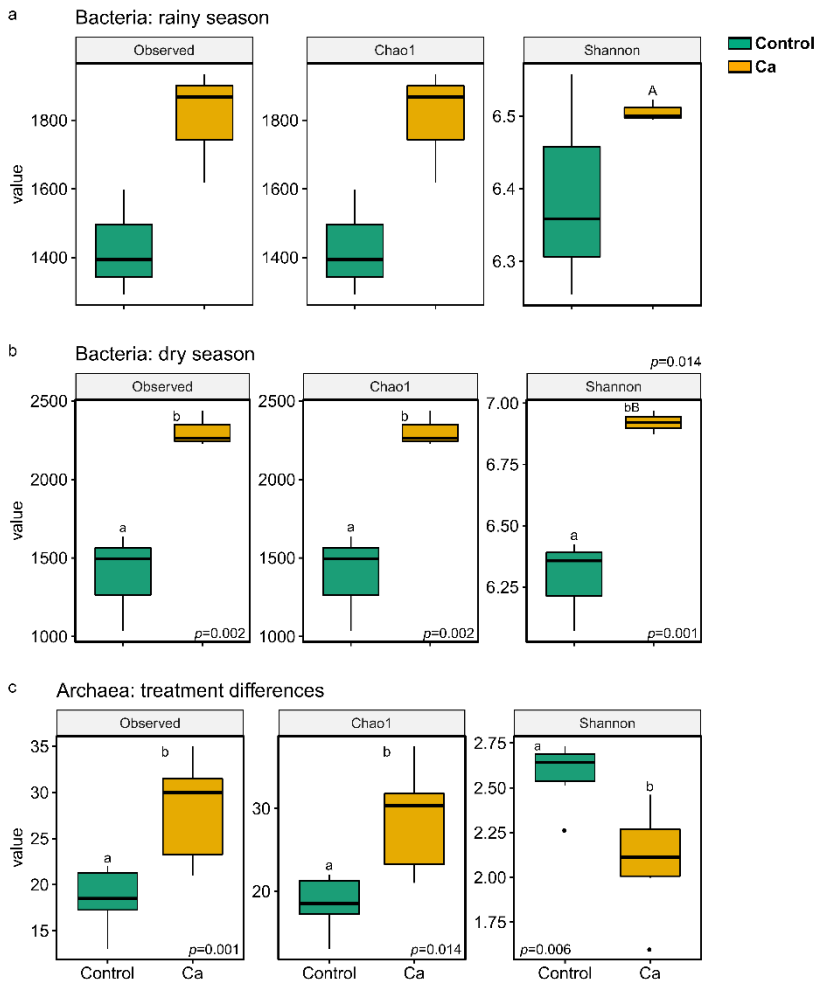


Fig. 3 α -diversities measures of the bacterial and archaeal communities in topsoil samples (0-10 cm) of the control and liming (Ca) treatments in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. **a)** Bacterial diversity in the rainy season; **b)** Bacterial diversity in the dry season; **c)** Archaeal diversity between treatments. Significant differences between treatments are indicated by lowercase letters with respective p -values inside the plot. Significant differences between seasons for each treatment are indicated by capital letters, with respective p -values outside the plot. Only significant differences are highlighted ($p < 0.05$).

Microbial community composition

There were differences in Bacteria and Archaea phyla abundances (Fig. 4; Table S5). Regardless the season, the most abundant bacterial phyla were Proteobacteria (30.3%), Acidobacteria (18.6%), Chloroflexi (14.1%) and Actinobacteria (12.2%). Phyla with intermediary abundance were Planctomycetes (8.3%), Verrucomicrobia (7.0%), Gemmatimonadetes (3.5%), Bacteroidetes (1.7%) and WPS-2 (1.3%). Rare bacterial phyla included Rokubacteria (0.8%), Armatimonadetes (0.7%), Patescibacteria (0.5%), GAL15 (0.5%) and Latescibacteria (0.4%). Analysis of STAMP indicated significant differences in bacterial OTU abundance at the phyla level between control and liming treatments ($p < 0.05$). The abundance of Acidobacteria, Chloroflexi, Verrucomicrobia, and WPS-2 decreased in the liming treatment while the abundance of most phyla increased in this treatment ($p < 0.05$). In particular, Latescibacteria was found exclusively in the liming plots. Only the abundances of the rare phyla GAL15 and Armatimonadetes were not affected by liming ($p > 0.05$). There were no seasonal differences in OTU abundances at the phylum level ($p > 0.05$). Regarding Archaea, Thaumarchaeota was the dominant phyla in all samples (77.9%), followed by Euryarchaeota (15.7%), Crenarchaeota (5.3%), Nanoarchaeaeota (1.0%) and Diapheotrites (0.1%). The abundances Thaumarchaeota

and Crenarchaeota decreased in the liming plots while the abundance of Euryarchaeota and Nanoarchaeota increased in this treatment. There were no seasonal differences in the abundance of archaeal phyla.

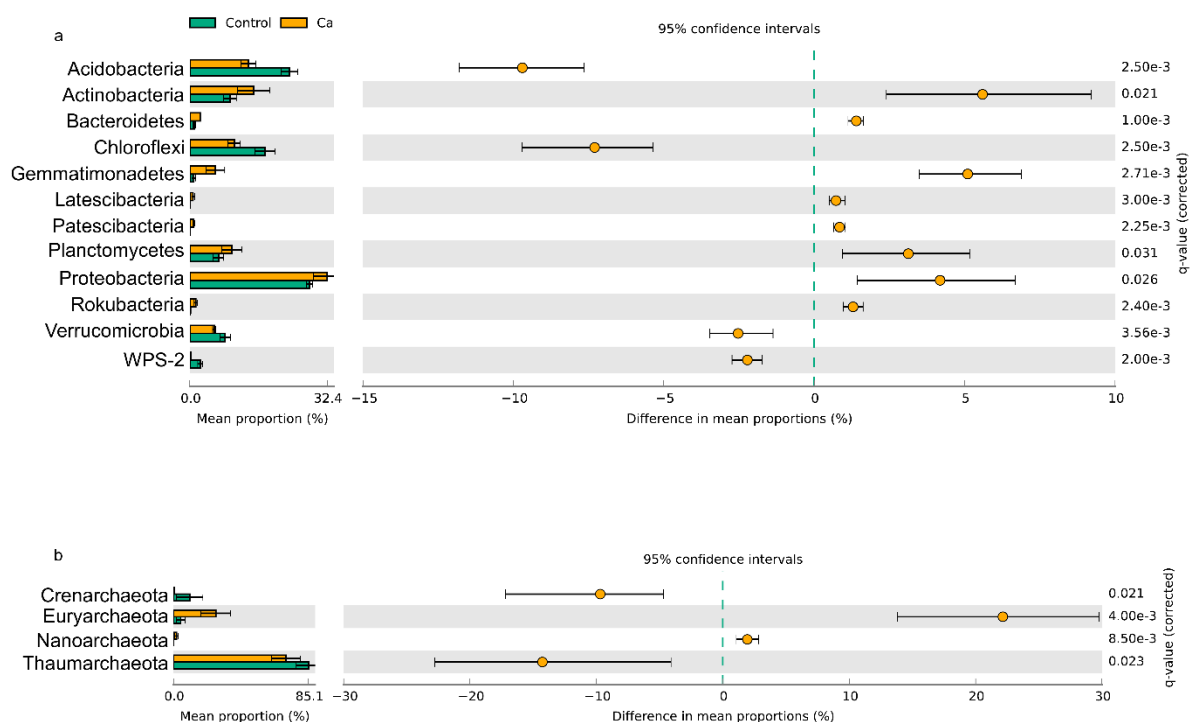


Fig. 4 Differences in abundances of microbial communities at phylum level between control and liming (Ca) soils (0-10cm) in a typical cerrado in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. **a)** Bacterial mean proportion; **b)** Archaeal mean proportion. Only significant differences are showed ($p < 0.05$).

Bacterial taxonomic diversity

Bacterial taxonomic profiles of high abundant taxa (frequency $\geq 10\%$) from control and liming plots during the rainy and dry seasons were plotted in heat-tree (Fig. 5). Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria classes dominated in the large Proteobacteria phylum. In general, Alphaproteobacteria was more abundant in the control treatment, and Gammaproteobacteria was more abundant in the liming treatment during the rainy season, while an inverse pattern was found during the dry season. The taxonomic subdivisions in the previously cited classes indicated the presence of genera such as *Bradyrhizobium*, *Pedomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Nordela*, *Steroidobacter*, *Ramlibacter* (Alphaproteobacteria), *Burkholderia*-*Caballeronia*-*Paraburkholderia*, *Ellin6067* (Gammaproteobacteria), among many others. The first two genera belong to different families (Xanthobacteraceae and Hyphomicrobiaceae, respectively) in Rhizobiales order and contributed to the high abundance of Alphaproteobacteria. The lineage *Ellin6067*, which belongs to the Nitrosomonadaceae family (in Betaproteobacteriales order from Gammaproteobacteria), increased in abundance about 22-fold in the liming treatment.

In the Acidobacteria phylum, eight and seven branches with the major classes were visualized for rainy and dry seasons, respectively. However, the dominant classes were Acidobacteriia and Blastocatellia

(Subgroup 4 - Gp4). In Acidobacteriia, we observed orders assigned to Solibacterales (which included genera as *Bryobacter* and *candidate Solibacter* - not shown), Acidobacterales, and Subgroup 2 (Gp2). In the case of Blastocatellia (Gp4), orders were assigned as Pyrinomonadales and Blastocatellales, both showing high abundances. All members of the Acidobacteriia class were more abundant in control during the dry season, and all members of the Blastocatellia class were more abundant in liming treatment in both seasons. Other taxa belonging to different clades in the Acidobacteria phylum were found, but most of them were assigned as uncultured.

The phylum Chloroflexi was more abundant in control plots due to the greater abundance of AD3, TK10, and Ktenodobacteria classes. However, other Chloroflexi lineages were found with a greater proportion in the liming treatment (e.g., KD4-96 and *Dehalococcoidia* representing TK10 members - not shown). Also, Anaerolineae represented another important class belonging to Chloroflexi, with almost all members showing a higher abundance in liming treatment in both seasons.

The three most abundant classes of Actinobacteria were Acidimicrobiia, Thermoleophilia, and Actinobacteria. Some lineages affiliated to the Actinobacteria class were more abundant in control plots than in liming plots. In contrast, lineages affiliated to Thermoleophilia and Acidimicrobiia presented higher abundance in the liming treatment. Most of the genera assigned to Actinobacteria phylum were found with higher abundance in the liming (e.g., *Actinophycola*, *Nocardioides*, *Acidothermus* from Actinobacteria class and *Solirubrobacter* and *Gaiella* from Thermoleophilia class).

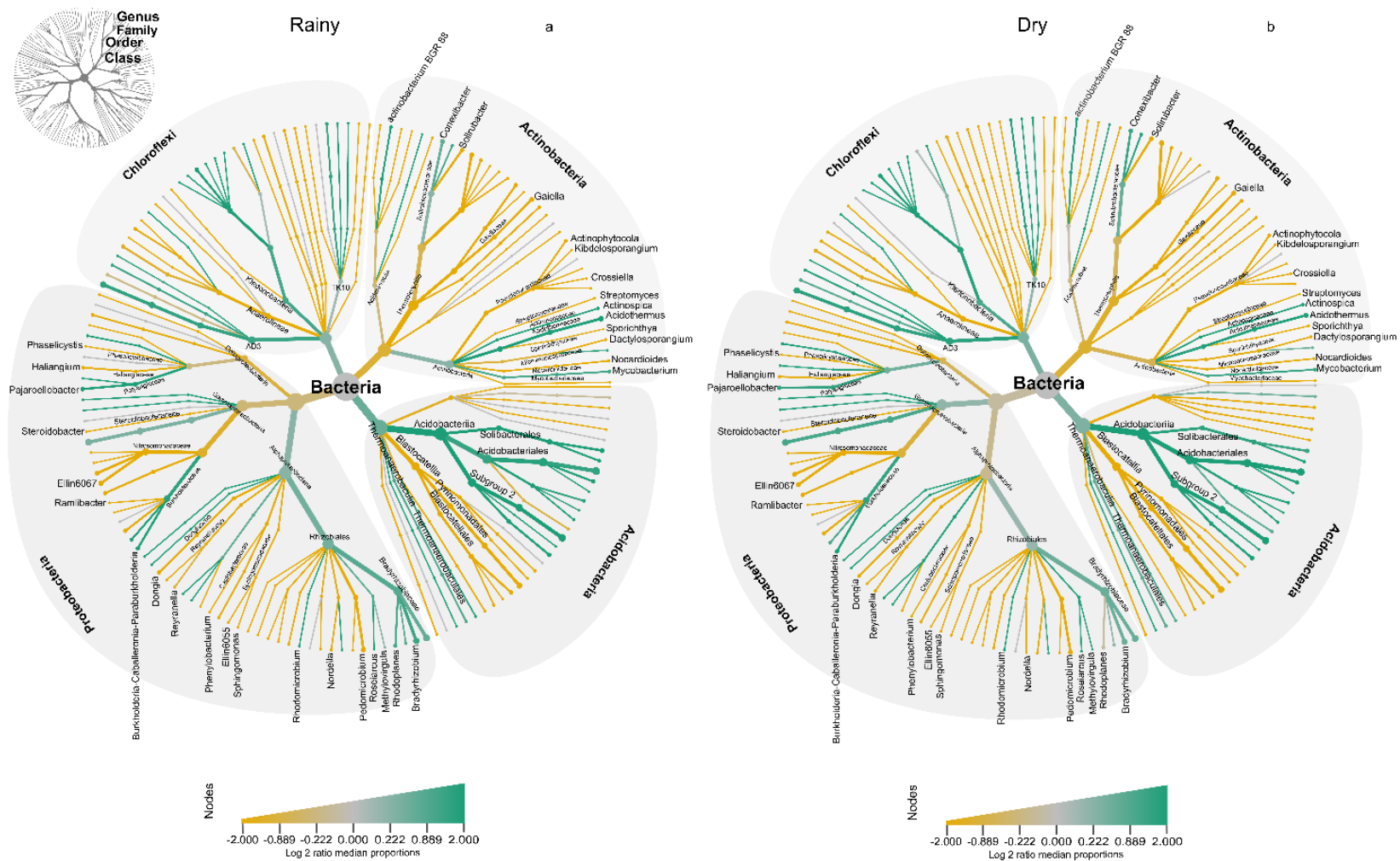


Fig. 5 Bacterial hierarchical taxonomic composition of the most representative taxa in topsoil samples (0-10 cm) of the control and liming (Ca) treatments, at seven taxonomic levels (initial filter by abundance at phyla level >10%). **a)** Dominant taxa in the rainy season; **b)** dominant taxa in the dry season. Long-term nutrient addition experiment in a typical cerrado located in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Green colors indicate more abundant taxa in the control and gold colors indicate more abundant taxa in the liming. Node size represents the relative proportions for that taxon.

Drivers of microbial community composition

The correlation plot performed for microbial abundance and soil properties showed bacterial and archaeal phyla correlated with one or more soil properties (Spearman; $p < 0.05$, Fig. 6a). Among the 14 bacterial phyla, six (Proteobacteria, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Rokubacteria, and Latescibacteria) correlated positively with soil pH while two (WPS 2 and Chloroflexi) correlated negatively. Interestingly, the phylum Acidobacteria was not significantly correlated with soil pH, but three orders of this phylum (Thermoanaerobaculales, Pyrinomonadales, and Blastocatellales) were positively correlated with it. We also found members of Proteobacteria, Actinobacteria, and Chloroflexi, correlated with soil pH. In Proteobacteria, the genus *Halliangium* was positively correlated only with soil pH. Among the five phyla annotated to Archaea, only Euryarchaeota and Nanoarchaeota correlated positively with soil pH.

The abundances of few microbial taxa were correlated with the soil CN ratio. Among them, two Proteobacteria genera (*Steroidobacter* and *Dongia*), four Actinobacteria genera (*Solirubrobacter*, *Nocardioide*, *Dactylosporangium*, *Actinophytocola*) and two Chloroflexi classes (TK10 and Anaerolineae) correlated positively soil CN ratio. For Acidobacteria, the order Blastocatellales was positively correlated with the CN ratio, while Subgroup 2 showed a negative correlation. For Archaea, Nanoarchaeota and Euryarchaeota phyla correlated positively with the CN ratio, but the correlation was negative for Crenarchaeota (Fig. 6).

Correlations with other soil properties usually followed their interactions with soil pH. For example, pH is positively correlated with Ca^{2+} and Mg^{2+} , and negatively correlated with exchangeable Al^{3+} and K^+ . Also, available P varied between groups in the same phylum but was predominantly negative correlated with them.

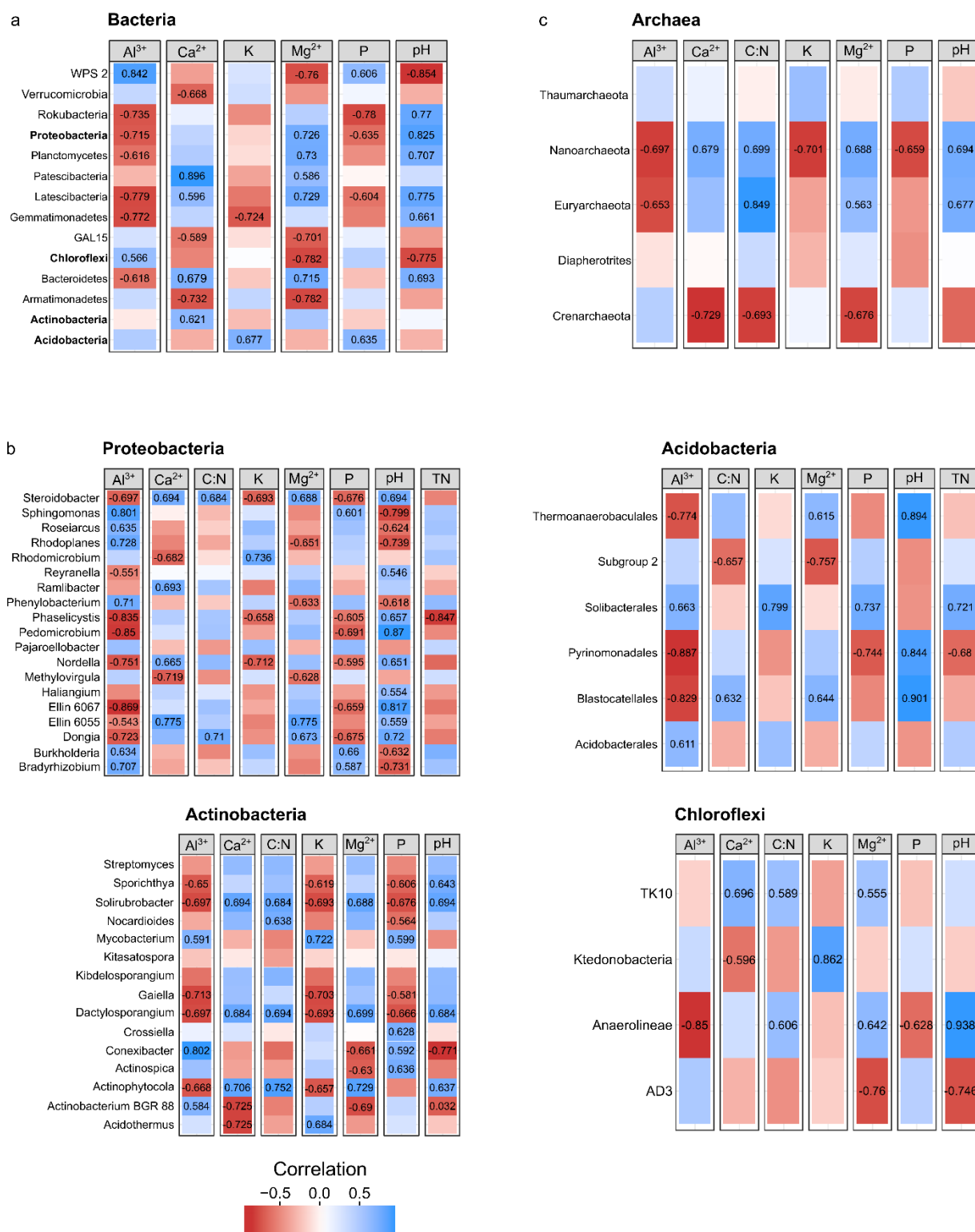


Fig. 6 Microbial taxa correlation with environmental variables from topsoil (0-10cm; Spearman, $p < 0.05$) collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a long-term nutrient addition experiment installed in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. **a**) Bacterial phylum; **b**) Relevant taxa affiliated to the four most abundant bacterial groups in different taxonomic levels (Proteobacteria and Actinobacteria: at the genus level, Acidobacteria: at the order level, and Chloroflexi: at class level); **c**) Archaeal phylum. Only significant environmental variables are shown for each group with their respective correlation score.

Functional predictions

The filtered functional predictions resulted in 386 KEGG identifiers linked to genes encoding key enzymes involved in C, N, P, and S metabolic pathways. Multiple comparisons analysis on STAMP showed more evident sample separation by treatment than by season, with the first PCA component accounting for 73.6% of enzyme-coding gene variation (Fig. 7a). The dendrogram clustered two distinct groups with a clear separation between control and liming treatments. There were no seasonal differences for both treatments (Fig. 7b). After dataset filtering by a minimum effect size of 2 in the comparison between treatments, 22 enzyme-encoding genes showed significant differences in abundances ($p < 0.05$). Most of the enzyme-encoding genes related to C, N, and S metabolism pathways showed a higher proportion in control plots, while only one gene was more abundant in the liming (Fig. 7c). For the C cycle, the metabolic pathway with higher abundance of genes encoding enzyme was related to photosynthesis by RuBisCO (K01601; K01602). In the N cycle, the main metabolic pathway with higher abundances of gene encoding enzymes were related to N fixation by nitrogenase enzymes (K00531; K02586; K02588; K02591). Finally, for the S cycle, the main metabolic pathway with higher abundance of gene encoding enzyme was related to the respiratory electron transport chain in the energy metabolism represented by cytochrome c (K08738). We did not find differences in KEGG associated with P metabolism. The supplementary material (Table S6) presents other general information.

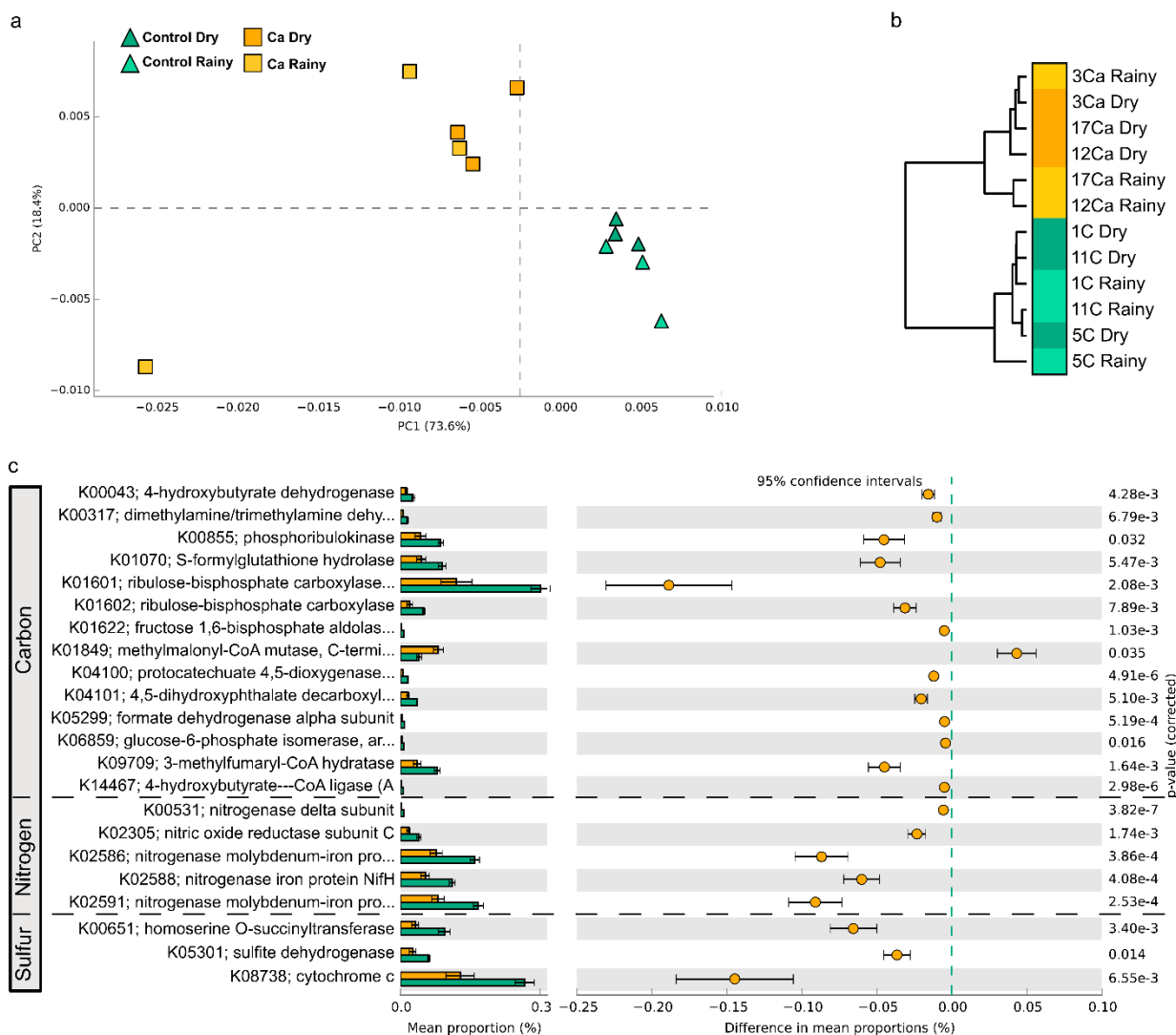


Fig. 7 KEGG functional categories comparisons between control and liming plots related to soil samples (0–10 cm) collected in the rainy and dry seasons of 2018 in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. **a)** Analysis of the principal components ordination (PCA), and **b)** Dendrogram clustering of KEGG distribution along treatment and seasons; **c)** Differences ($p < 0.05$; effect size > 2) in functional profiles associated with carbon, nitrogen, and sulfur metabolism pathways. Differences in mean proportions based on KEGG abundances between treatments. The vertical dashed green line indicates control. Horizontal dashed lines divide the metabolic pathways. KEGG identifiers are listed, followed by their respective enzyme-coding genes.

DISCUSSION

Long and short-term effects of liming in soil

The high soil chemical differentiation found in liming treatment compared to control prior and after the liming resumption confirms the strong residual effects of liming in the experimental area (Fig. 1; Table S1 and S2). These effects are associated with soil pH, which in turn promotes many other changes in soil chemical properties. For example, as expected, the increase in pH values in liming treatment promoted the increase in the exchangeable cations Ca^{2+} and Mg^{2+} and the reduction in K^+ content, which is removed from the soil exchange complex due to its lower charge density. In addition, the increase in pH led to the exclusion

of labile Al from the soil, which is widely known as a toxic metal for the majority of plants (Haridasan 2008; Silva 2012; Sade et al. 2016) and also could influence microbial communities in soils (Piña and Cervantes 1996; Kunito et al. 2016).

The variability in soil properties in control plots between years (Table S3) could represent an effect of the atypical rainfall in the sampling period of 2017, which was approximately five-fold lower than annual historic mean precipitation for the month (April) (INMET, <http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>). In the liming treatment, the lower variability in soil properties between the periods before and after the liming resumption could reflect the low incorporation of the lime into soils in this short time frame. Thus, the cumulative effects of past lime additions could be more determinant to the observed changes in soils than short-term effects.

Microbial community diversity

The soil microbiome remained strongly altered in diversity and composition after the liming resumption (Fig. 3). The long-term liming effects promoted the increase in bacterial richness and diversity but reduced the archaeal diversity. Seasonally, the higher bacterial diversity during the dry season in liming plots may be related to the interactive effects between the absence of rainfall and the increased nutrients promoted by liming itself. Also, plant production and nutrient uptake could be reduced during the dry season, leading to the accumulation of nutrients on soil (Bustamante et al. 2006) including mobile elements that are usually easily leached (Motta et al. 2002) except the concentration of N reactive which decreased during this period (Table S2). Previous measurements of N-NO_3^- and exchangeable N-NH_4^+ in our experimental area demonstrate less seasonal variation in inorganic N concentrations (unpublished data), suggesting significant variability in the reactive N in these soils. Furthermore, the slight fluctuations in the abundance of different phyla, such as decreases in the abundance of some dominant groups with concomitant increases in less abundant phyla, could have contributed to higher bacterial diversity in this season.

Microbial community composition, taxonomic diversity and environmental drivers

The soil microbiome was dominated by Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, and Actinobacteria and by the archaeal phyla Thaumarchaeota and Euryarchaeota (Fig. 4; Table S5). Previous studies already indicated those phyla as predominant in Cerrado soils, with some variation in their abundances in response to land use, vegetation type or rainfall seasonality (Catão et al. 2013; Pereira de Castro et al. 2016; Souza et al. 2016; de Araujo et al. 2017; Belmok et al. 2019; Silva et al. 2019). Our findings indicate differences in the microbial communities in response to liming at the phylum level (Fig. 4) and high variability in the responses among its subdivisions (Fig. 5). Acidobacteria phylum decreased slightly in the liming because of Blastocatellia (Gp4) and other groups that showed lower abundance compared to class Acidobacteriia. This result could be associated with a common effect related to changes in nutrient availability and pH since Acidobacteria is described as being adapted to oligotrophic and acidic environments

(Kielak et al. 2016; Eichorst et al. 2018). However, some taxonomic groups inside Acidobacteria had their abundances increased in liming treatment (e.g., Pyrinomonadales and Blastocatellales), reinforcing the high plasticity of Acidobacteria phylum (Kielak et al. 2016; Eichorst et al. 2018). The same occurred amongst Chloroflexi-affiliated groups, which were more abundant in the control soils due to the greater abundance of AD3, TK10, and Ktenodobacteria classes. On the other hand, other classes inside Chloroflexi showed higher abundance in liming treatment (e.g., Anaerolineae) (Fig. 5).

For Proteobacteria, the Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria classes could also be influenced by seasonality, with converse patterns of abundance between rainy and dry seasons. However, effects of seasonality occurred to a minor degree compared to liming effects (Fig. 5). There were genus-specific responses in the same family, such as with *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* and *Ramlibacter*, whose abundances were negatively and positively influenced by liming, respectively. Members of the family Solirubrobacteraceae and other subdivisions in Actinobacteria phylum responded similarly (Fig. 5). These particularities in microbial responses may be an outcome of metabolic versatility in many groups (Aislabie et al. 2013; Pereira de Castro et al. 2016) and indicate how important it is to consider lower taxonomic levels in order to better understand microbial processes and ecology (Rampelotto et al. 2013).

Shifts on microbial assemblage in liming soils were strongly related to changes in soil chemical properties, which contribute as ecological stressors, shaping changes in microbial communities. Some studies indicate soil pH as the primary driver of microbial community diversity and abundance in most diverse terrestrial ecosystems (Tripathi et al. 2015; Pajares et al. 2016; Lynn et al. 2017; Silva et al. 2019). Generalizations indicate that the pH closer to neutral could favor bacterial groups while Archaea could have competitive advantage in more acidic pH (Tripathi et al. 2015; Rughöft et al. 2016; Wu et al. 2017), but our results agree with more recent studies pointing to the necessity of considering direct and indirect effects of pH, such as the ones promoted in nutrient availability, cycling and even plant growth (Lammel et al. 2018). Thus, since pH was not the only property altered in the area, other changes reported in the experiment should also be considered as a potential secondary contributor to changes in soil microbiome composition, such as soil chemical properties and vegetation characteristics. For example, before the first fertilizer additions in 1998, soils did not show significant differences in pH, nutrient contents, or vegetation structure (Kozovits et al. 2007). Initially, after experiment implementation, pH changes were not significant; instead, other short-term effects of limestone additions could be observed right in the first study in the area. The limestone addition promoted the acceleration of the decomposition rates of OM, increased the density of bacteria, and altered available nutrient contents (unpublished data). Remarkable alterations in pH values were described in a later study (Bustamante et al. 2012). While investigating medium and long-term effects in vegetation, limestone addition reduced the cover of native grass *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase, favored the invasion by the African grass *Melinis minutiflora* P. Beauv., and also influenced the presence of other grasses (de Mello et al. 2014). Changes in plant communities have been described as potential regulators of the composition of microbial through the release of root exudates in the rhizosphere (Zhalnina et al. 2018).

Although we focused on bulk soil, we could not wholly disregard the probable influence of the rhizosphere, since our study area presents a vast herbaceous-subshrub layer plant cover (de Mello et al. 2014). Along with pH, these effects could also reflect shifts in microbial communities, even though we did not measure all those effects directly in this work.

Microbial functional profile

The crucial role of microbes in regulating ecosystems process is widely recognized but poorly understood. Particularly for the Cerrado soil microbiome, the assessment of functional approaches has been reported in a few studies (Pereira de Castro et al. 2016; Souza et al. 2016, 2018). Our research investigates how long-term lime addition shapes community composition and potentially affects soil microbiome function. Here, we performed the functional prediction to explore the possible metabolic functions of soil microbiome, providing a first insight into the experimental area's microbial process. Contrary to the taxonomic and ecological estimators of diversity, the liming treatment reduced the predicted functional profile associated with C, N, and S metabolism (Fig. 7). This result is in accordance to Souza et al. (2016), indicating no association between taxonomic and functional diversity in cerrado soils under native vegetation and crop production.

The annotations of enzyme-encoding genes indicated a potential reduction in C fixation in soils from liming treatment, especially by photosynthetic pathways catalyzed by RuBisCO enzyme (Fig. 7). RuBisCo proteins or their homologs could be present in bacteria for which the abundance was negatively affected by liming, such as members of Chloroflexi (Tabita et al. 2007; Shih et al. 2017) and Proteobacteria (e.g., *Bradyrhizobium* and *Burkholderia*; Fig. 5) (Badger and Bek 2008; Gourion et al. 2011). Other studies suggest that liming affects C immobilization by chemical ways or through an increase in microbial respiration and biomass (Bezdicsek 2003; Fuentes et al. 2006). Thus, liming could result in increased CO₂ production and high emissions through soils (Fuentes et al. 2006; Biasi et al. 2008; Marcelo et al. 2012).

Against the general assumption that limestone addition could promote greater N fixation (Van Zwieten et al. 2015) and stimulate microbial enzymes for nitrification (Senwo and Tabatabai 2005), our results indicated the majority of predicted metabolism pathways associated with N₂ fixation were reduced in liming plots. Furthermore, there was a higher abundance of known N fixer microorganisms in control plots, such as Bradyrhizobiaceae and Burkholderiaceae members (Lindström et al. 2015; Pajares et al. 2016). We also found in the control plots the enzyme encoding gene nitric oxide reductase cytochrome c-dependent (Fig. 7) involved in the reduction of nitric oxide to nitrous oxide that could be present in denitrifying microorganisms, suggesting that liming could stimulate the complete reduction of N₂O to N₂ (Liu et al. 2014). Finally, genes related to the S cycle encoded enzymes classes of oxidoreductases acting on a S group of donors, were potentially enriched in preserved soils from control plots. These enzyme encoding genes could play significant roles in microbial energy metabolism and promote H⁺ gradients in soils (Klotz, Bryant and Hanson 2011). This result represents an indication of a reduction in microbial S metabolism in soils under

lime addition. Further investigations on processes mediated by the microbial community in cerrado soils could help to elucidate this interaction.

Functional predictions 16S-based can provide an initial frame into potential microbial functions, but further studies using metagenomic shotgun analysis are needed to improve resolution and clarify our findings in predicted metabolic pathways. However, our results provide a basis for future analysis of potential liming impacts on microbial functional profile, which require attention due to the current trends of land use in Cerrado, diversity loss, and global changes.

CONCLUSIONS

Soil pH was a critical driver of change for the microbial community composition with different effects on bacterial and archaeal groups. Other alterations in soil properties and vegetation cover in response to liming could also be involved in the observed microbial communities' change in abundance, diversity, and potential functional traits of microbial groups, even after 11 years without new lime additions.

Despite the methodological limitations to infer about microbial processes, our results indicate a significant reduction of multifunctionality promoted by liming on soil microbiome under cerrado vegetation. Further investigations on absolute microbial abundances and specific functional gene expression should be considered in the future for a more comprehensive assessment of liming effects on the diversity and functioning of the microbial community.

REFERENCES

- Aislabie J, Deslippe JR, Dymond JR (2013) Soil microbes and their contribution to soil services. In: Dymond JR (Ed) *Ecosystem services in New Zealand - conditions and trends*. Mannaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, pp 143–161
- Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH, Nielsen PH (2015) Back to basics – the influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities. *PLoS One* 10:e0132783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132783>
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 02 December 2019
- Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 75:129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Alshauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P (2015) Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* 31:2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Badger MR, Bek EJ (2008) Multiple RuBisCO forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *J Exp Bot* 59:1525–1541. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm297>
- Belmok A, Rodrigues-Oliveira T, Lopes FAC, Miranda HS, Krüger RH, Kyaw, CM (2019) Long-term effects of periodical fires on archaeal communities from Brazilian Cerrado soils. *Archaea* 2019:1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/6957210>
- Bezdicek D, Beaver T, Granatstein D (2003) Subsoil ridge tillage and lime effects on soil microbial activity, soil pH, erosion, and wheat and pea yield in the Pacific Northwest, USA. *Soil Till Res* 74:55–63. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00091-6)
- Biasi C, Lind SE, Pekkarinen NM, Huttunen JT, Shurpali NJ, Hyvönen NP, Repo ME, Martikainen PJ (2008) Direct experimental evidence for the contribution of lime to CO₂ release from managed peat soil. *Soil Biol Biochem*

- 40:2660–2669. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.011>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR et al (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bushnell B (2014) BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner (No. LBNL-7065E). Lawrence Berkeley National Lab.(LBNL), Berkeley, CA (United States). <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbmap-guide/>. Accessed 03 December 2019
- Bustamante MMC, de Brito DQ, Kozovits AR, Luedemann G, de Mello TRB, Pinto AS, Munhoz CBR, Takahashi FSC (2012) Effects of nutrient additions on plant biomass and diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plant Ecol* 213:795–808. <https://doi.org/10.1007/s11258-012-0042-4>
- Bustamante MMC, Medina E, Asner GP, Nardoto GB, Garcia-Montiel DC (2006) Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79:209–237. <https://doi.org/10.1007/s10533-006-9006-x>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11:2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Catão E, Castro AP, Barreto CC, Krüger RH, Kyaw CM (2013) Diversity of Archaea in Brazilian savanna soils. *Arch Microbiol* 195:507–512. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0882-x>
- de Araujo AS, Bezerra WM, dos Santos VM, Rocha SMB, Carvalho NS, Lyra MCCP, Figueiredo MVB, Lopes ACA, Melo VMM (2017) Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. *Anton Leeuw Int J G*, 110(4):457–469. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0815-1>
- de Mello TRB, Munhoz CBR, Bustamante MMC (2014) Effects of nutrient additions on the diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). In: Sutton MA, Mason KE, Sheppard LJ, Sverdrup H, Haeuber R, Hicks WK (Eds) *Nitrogen deposition, critical loads and biodiversity*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 147–154. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7939-6_16
- Eichorst SA, Trojan D, Roux S, Herbold C, Rattei T, Woebken D (2018) Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. *Environ Microbiol* 20:1041–1063. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>
- Eiten G (1972) The Cerrado vegetation of Brazil. *Bot Rev* 38:201–341. <https://doi.org/10.1007/BF02859158>
- Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008) The microbial engines that drive Earth’s biogeochemical cycles. *Science* 320:1034–1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Foster ZSL, Sharpton TJ, Grünwald NJ (2017) Metacoder: an R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput Biol* 13:e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>
- Fuentes-Pardo AP, Ruzzante DE (2017) Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: advantages, limitations and practical recommendations. *Mol Ecol* 26:5369–5406. <https://doi.org/10.1111/mec.14264>
- Fuentes JP, Bezdicek DF, Flury M, Albrecht S, Smith JL (2006) Microbial activity affected by lime in a long-term no-till soil. *Soil Till Res* 88:123–131. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.05.001>
- Furley PA (1999) The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecol Biogeogr* 8:223–241. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.1999.00142.x>
- Gourion B, Delmotte N, Bonaldi K, Nouwen N, Vorholt JA, Giraud E (2011) Bacterial RuBisCO is required for efficient Bradyrhizobium/Aeschynomene symbiosis. *PLoS One* 6:e21900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021900>
- Graham EB, Knelman JE, Schindlbacher A, Siciliano S, Breulmann M, Yannarell A, Beman JM, Abell G, Philippot L, Prosser J, Foulquier A, Yuste JC, Glanville HC, Jones DL, Angel R, Salminen J, Newton RJ, Bürgmann H, Ingram LJ, Hamer U, Siljanen HMP, Peltoniemi K, Potthast K, Bañeras L, Hartmann M, Banerjee S, Yu RQ, Nogaro G, Richter A, Koranda M, Castle SC, Goberna M, Song B, Chatterjee A, Nunes OC, Lopes AR, Cao Y, Kaisermann A, Hallin S, Strickland MS, Garcia-Pausas, J, Barba J, Kang H, Isobe K, Papaspyrou S, Pastorelli R, Lagomarsino A, Lindström ES, Basiliko N, Nemergut DR (2016) Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Front Microbiol* 7:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00214>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4(1): 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Accessed 20 December 2019
- Haridasan M (2008) Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Braz J Plant Physiol*

- 20:183–195. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000300003>
- Hariharan J, Sengupta A, Grewal P, Dick WA (2017) Functional predictions of microbial communities in soil as affected by long-term tillage practices. *Agric Environ Lett* 2:170031. <https://doi.org/10.2134/aer2017.09.0031>
- Jacobson TKB, Bustamante MMC (2019) Effects of nutrient addition on polyphenol and nutrient concentrations in leaves of woody species of a savanna woodland in Central Brazil. *J Trop Ecol* 35:288–296. <https://doi.org/10.1017/S0266467419000257>
- Jacobson TKB, Bustamante MMC, Kozovits AR (2011) Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environ Pollut* 159:2236–2242. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.019>
- Kaiser K, Wemheuer B, Korolkow V, Wemheuer F, Nacke H, Schöning I, Schrupf M, Daniel R (2016) Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Sci Rep* 6:33696. <https://doi.org/10.1038/srep33696>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA, Kuramae EE (2016) The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front Microbiol* 7:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>
- Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv Biol* 19:707–713. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x>
- Klotz MG, Bryant DA, Hanson TE (2011) The microbial sulfur cycle. *Front Microbiol* 2:241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00241>
- Kozovits AR, Bustamante MMC, Garofalo CR, Bucci S, Franco AC, Goldstein G, Meinzer FC (2007) Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a neotropical savanna. *Funct Ecol* 21:1034–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01325.x>
- Kunito T, Isomura I, Sumi H, Park HD, Toda H, Otsuka S, Nagaoka K, Saeki K, Senoo K (2016) Aluminum and acidity suppress microbial activity and biomass in acidic forest soils. *Soil Biol Biochem* 97:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.019>
- Lammel DR, Barth G, Ovaskainen O, Cruz LM, Zanatta JA, Ryo M, Souza EM, Pedrosa FO (2018) Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. *Microbiome* 6:106. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0482-8>
- Lindström K, Amsalu Aserse A, Mousavi SA (2015) Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on Rhizobia. In: Bruijn FJ (Ed) *Biological nitrogen fixation*. Wiley, Hoboken, NJ, pp 21–38. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch3>
- Liu B, Frostegård Å, Bakken LR (2014) Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of nosZ. *mBio* 5:e01383-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01383-14>
- Liu L, Gundersen P, Zhang W, Zhang T, Chen H, Mo J (2015) Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Sci Rep* 5:14378. <https://doi.org/10.1038/srep14378>
- Lopes AS, Cox FR (1977) A survey of the fertility status of surface soils under “Cerrado” vegetation in Brazil. *Soil Sci Soc Am J* 41:742–747. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100040026x>
- Lynn TM, Liu Q, Hu Y, Yuan H, Wu X, Khai AA, Wu J, Ge T (2017) Influence of land use on bacterial and archaeal diversity and community structures in three natural ecosystems and one agricultural soil. *Arch Microbiol* 199:711–721. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1347-4>
- Marcelo AV, Corá JE, Scala Junior NL (2012) Influence of liming on residual soil respiration and chemical properties in a tropical no-tillage system. *Rev Bras Ciênc Solo* 36:45–50. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000100005>
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17:10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Medina E (1993) Mineral nutrition: tropical savannas. In: Behnke HD, Lüttge U, Esser K, Kadereit JW, Runge M (Eds) *Progress in Botany / Fortschritte der Botanik*, 54th edn. Springer, Berlin, pp 237–253. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78020-2_12

- Meier M (1991) Nitratbestimmung in boden-proden (N-min-methode). Labor Praxis, Berlin, pp 244–247
- Motta PEF, Curi N, Franzmeier DP (2002) Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira PS, Marquis RJ (Eds) The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical. Columbia University Press, New York, pp 13–33
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nannipieri P, Ascher-Jenuil J, Ceccherini MT, Pietramellara G, Renella G, Schloter M (2020) Beyond microbial diversity for predicting soil functions: a mini review. *Pedosphere* 30:5–17. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60824-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60824-6)
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54:655–670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Nicolitch O, Feucherolles M, Churin J-L, Fauchery L, Turpault MP, Uroz S (2019) A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Sci Rep* 9:14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50730-y>
- Oliveira RS, Bezerra L, Davidson EA, Klink CA, Nepstad DC, Moreira A (2005) Deep root function in soil water dynamics in cerrado savannas of central Brazil. *Funct Ecol* 19:574–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.01003.x>
- Pajares S, Bohannan BJM (2016) Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Front Microbiol* 7:1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01045>
- Pajares S, Bohannan BJM, Souza V (2016) Editorial: the role of microbial communities in tropical ecosystems. *Front Microbiol* 7:1805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01805>
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18:1403–1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG (2014) STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30:3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pereira de Castro A, Silva MRSS, Quirino BF, Bustamante MMC, Krüger RH (2016) Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLoS One* 11:e0148785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148785>
- Piña RG, Cervantes C (1996) Microbial interactions with aluminium. *Biometals* 9:311–316. <https://doi.org/10.1007/BF00817932>
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2009) FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* 26:1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Leonardecz Neto E, Silva MRSS, Bustamante MMC, Krüger RH (2009) Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol Res* 164:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.12.001>
- Rampelotto PH, Ferreira A de S, Barboza ADM, Roesch LFW (2013) Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. *Microb Ecol* 66:593–607. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0235-y>
- Rughöft S, Herrmann M, Lazar CS, Cesarz S, Levick SR, Trumbore SE, Küsel K (2016) Community composition and abundance of bacterial, archaeal and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. *Front Microbiol* 7:1638. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01638>
- Sade H, Meriga B, Surapu V, Gadi J, Sunita MSL, Suravajhala P, Kavi Kishor PB (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29:187–210. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9910-z>
- Schöler A, Jacquiod S, Vestergaard G, Schulz S, Schloter M (2017) Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biol Fertil Soils* 53:485–489. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1205-1>
- Senwo ZN, Tabatabai MA (2005) Effect of management systems on nitrogen mineralization and nitrification in soils. *Commun Soil Sci Plan* 36:1313–1326. <https://doi.org/10.1081/CSS-200056942>
- Shih PM, Ward LM, Fischer WW (2017) Evolution of the 3-hydroxypropionate bicycle and recent transfer of

- anoxygenic photosynthesis into the Chloroflexi. *PNAS* 114:10749–10754.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1710798114>
- Silva S (2012) Aluminium toxicity targets in plants. *J Bot* 2012:1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/219462>
- Silva MRSS, Pereira de Castro A, Krüger RH, Bustamante MMC (2019) Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: response to vegetation type and management. *Acta Oecol* 100:103463.
<https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.103463>
- Souza RC, Cantão ME, Nogueira MA, Vasconcelos ATR, Hungria M (2018) Outstanding impact of soil tillage on the abundance of soil hydrolases revealed by a metagenomic approach. *Braz J Microbiol* 49:723–730.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.03.001>
- Souza RC, Mendes IC, Reis-Junior FB, Carvalho FM, Nogueira MA, Vasconcelos ATR, Vicente VA, Hungria M (2016) Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: how fragile is the Brazilian Cerrado? *BMC Microbiol* 16:42. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0657-z>
- Sridevi G, Minocha R, Turlapati SA, Goldfarb KC, Brodie EL, Tisa LS, Minocha SC (2012) Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiol Ecol* 79:728–740. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01258.x>
- Ssekagiri A, Sloan WT, Ijaz UZ (2018) microbiomeSeq: an R package for analysis of microbial communities in an environmental context. In: ISCB Africa ASBCB conference on Bioinformatics. International Society for Computational Biology, Entebbe, Uganda, pp B-064. <http://www.github.com/umerijaz/microbiomeSeq>. Accessed 20 December 2019
- Sugihara S, Shibata M, Mvondo Ze AD, Araki S, Funakawa S (2015) Effects of vegetation on soil microbial C, N, and P dynamics in a tropical forest and savanna of Central Africa. *Appl Soil Ecol* 87:91–98.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.11.002>
- Tabita FR, Hanson TE, Li H, Satagopan S, Singh J, Chan S (2007) Function, structure, and evolution of the RuBisCO-like proteins and their RuBisCO homologs. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:576–599.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-07>
- Tripathi BM, Kim M, Tateno R, Kim W, Wang J, Lai-Hoe A, Shukor NAA, Rahim RA, Go R, Adams JM (2015) Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biol Biochem* 88:1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.004>
- Van Zwieten L, Rose T, Herridge D, Kimber S, Rust J, Cowie A, Morris S (2015) Enhanced biological N₂ fixation and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) in an acid soil following biochar addition: dissection of causal mechanisms. *Plant Soil* 395:7–20. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2427-3>
- Větrovský T, Baldrian P (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8:e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Wu Y, Zeng J, Zhu Q, Zhang Z, Lin X (2017) pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Sci Rep* 7:40093.
<https://doi.org/10.1038/srep40093>
- Xiong J, Liu Y, Lin X, Zhang H, Zeng J, Hou J, Yang Y, Yao T, Knight R, Chu H (2012) Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Environ Microbiol* 14:2457–2466.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02799.x>
- Zhalnina K, Louie KB, Hao Z, Mansoori N, da Rocha UN, Shi S, Cho H, Karaoz U, Loqué D, Bowen BP, Firestone MK, Northern TR, Brodie EL (2018) Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat Microbiol* 3:470–480.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>

Chapter 3 - Seasonal and long-term effects of nutrient additions and liming on the potential activity of nitrogen fixation in Cerrado soils

ABSTRACT

Savannas cover an extensive area in the tropics and account for approximately 30% of global terrestrial primary production. Biological nitrogen-fixation (BNF) is estimated to be the most extensive nitrogen (N) input in tropical savannas. Brazilian savannas (locally known as Cerrado) are the second largest vegetation in South America, and soils are mostly dystrophic. BNF could be particularly important for Cerrado ecosystems that show N and P co-limitation and a highly conservative N cycle. However, very little is known about the environmental drivers influencing the BNF dynamics in these soils. We evaluated the effects of seasonal precipitation, nutrient limitation removal, and soil pH on the potential N-fixing activity by soil non-symbiotic diazotrophic community. Here we report the *nifH* gene relative abundance using the qPCR technique in soil samples from a long-term fertilization experiment (started in 1998) in a Cerrado's natural area. The experiment consists of five treatments: **1)** untreated control, **2)** liming treatment, **3)** nitrogen addition (N), **4)** nitrogen plus phosphorus addition (NP) and **5)** phosphorus addition (P). The *nifH* gene sequence was most closely related to *Bradyrhizobium* members. Seasonal effects on N-fixing potential were observed by a decrease in the *nifH* gene relative quantities from rainy to dry season in control, N, and NP treatments. Also, the *nifH* gene counts decreased in the liming and P treatment compared with the control during the rainy season. A noticeable reduction in *nifH* counts was found in the liming treatment in the rainy and dry seasons. The findings evidenced the multiple factors controlling the potential N₂ fixation by free-living diazotrophs in these nutrient-limited and seasonally-dry ecosystems.

Keywords: Biogeochemical cycle, Tropical savanna, Soil process, *nifH* gene, Free-living diazotrophs

INTRODUCTION

Over the last decades, the attention of the scientific community has increased towards the substantial role of tropical regions in many biogeochemical cycles, especially on the N budget. The nitrogen cycle is a complex set of processes (Box 1) vastly mediated by soil microorganisms (Galloway et al., 2004; Hietz et al., 2011; Pajares and Bohannan, 2016; Reed et al., 2010; Swift et al., 1998). The majority of studies focus on forest ecosystems (Brookshire et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Hietz et al., 2011; Homeier et al., 2017). However, tropical savannas could also play a significant role in critical processes of the N cycle process (Bustamante et al., 2006), such as in the biological nitrogen fixation (BNF), considered as the main source of N in these areas with estimated inputs ranging from 16 to 44 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ (Cleveland et al., 1999).

The Brazilian Cerrado is the second largest biome in South America, covering about 24% of the national territory and predominates in central Brazil (Ribeiro and Walter, 2008). It is considered as one of the most heterogeneous and biodiverse tropical savanna's worldwide, known to support a highly complex vegetation structure that evolved under interactions between water and nutrient availability (Haridasan, 2008; Myers et al., 2000; Reatto et al., 2008; Silva et al., 2008). The soil microbial communities in this biome have been studied in terms of composition, diversity, and richness (Araujo et al., 2012; Pereira de Castro et al., 2016; Quirino et al., 2009; Rampelotto et al., 2013; Viana et al., 2011). However, information on the role of microorganisms in nitrogen cycling remains scarce. In particular, information on the impact of nutrient enrichment in soil microbiome from natural areas has been poorly discussed.

Nitrogen is the main component of proteins and nucleic acids, and therefore, it is considered one of the most critical elements for the existence of life on Earth. The N turnover comprises a series of complex and dynamic reactions strongly dependent on environmental oxidizing or reducing conditions. These reactions (Box 1) are typically divided into BNF, nitrification, denitrification, *anammox* (anaerobic ammonia oxidation) and ammonification processes (Canfield et al., 2010; Stein and Klotz, 2016) catalyzed by specific microbial enzymes (Correa-Galeote et al., 2014). In Cerrado soils, the most substantial fraction of inorganic N in the soil is in the NH_4^+ form, and the N cycle stages that occur under anaerobic conditions little contribute to the N balance (Nardoto and Bustamante, 2003). Net nitrification in native cerrado soils, for example, is often undetectable (Nardoto and Bustamante, 2003) and emissions of NO_x and N_2O are very low, suggesting a highly conservative N cycle (Fernandes Cruvinel et al., 2011; Pinto, 2002). Thus, BNF can represent the most critical process of N metabolism in Cerrado soils, as observed for many terrestrial ecosystems, where this process represents about 97% of natural N inputs (Galloway et al., 2004; Vitousek et al., 2002).

In BNF, the non-reactive gaseous form of dinitrogen (N_2) is assimilated and transformed only by a select group of microorganisms that can be plant symbionts or free-living diazotrophic and making the understanding of the microbial ecology involved in BFN essential (Pajares and Bohannan, 2016; Reed et al., 2010). These microorganisms can express the nitrogenase enzyme codified by *nif* genes. The *nifH* gene has been accessed as the target with molecular techniques for studies on the potential of microbial communities to fix atmospheric N_2 (Gaby and Buckley, 2012, 2011; Pajares and Bohannan, 2016). The gene encodes the iron-protein subunit of the nitrogenase enzyme complex in Bacteria and Archaea (Zehr et al., 2003), whose role is to catalyze the reduction of N_2 to NH_4^+ in the BNF, a high energy-demanding process (Shridhar, 2012; Zehr et al., 2003). From this process, reactive N forms required for the biosynthesis of macromolecules are made available for plant uptake. Since the *nifH* gene is widely distributed between Bacteria and Archaea with conserved sequences in both domains (Zehr et al., 2003), it may be considered a useful biological marker to infer the ecological role and potential of the microbial community in N-fixing (Gaby and Buckley, 2012). Proteobacteria members and other taxonomic groups (Dahal et al., 2017; Mirza et al., 2014) commonly presented in Cerrado soils (Pereira de Castro et al., 2016; Quirino et al., 2009; Souza et al., 2016) contain the *nifH*. The Cerrado' soil microbiome is sensitive to changes in soil chemical properties and management (Silva

et al., 2019; Souza et al., 2016), and also responds to the marked seasonality that regulates the water availability in the biome (Pereira de Castro et al., 2016). Likewise, the BFN could be affected by environmental changes promoted by liming and nutrient additions into soils (both standard practices in agricultural areas in the Cerrado). Other N metabolism processes were altered in Cerrado soils under fertilization with N and N combined with P. There was an increase in the emissions of NO_x when only the N was added into the soils. On the other hand, emissions of NO_x were lower when the N fertilizer was added together with P (Jacobson et al., 2011). These results indicate a greater immobilization of N in the biomass and reinforce the co-limitation of the N cycling in cerrado soils by N and P (Jacobson et al., 2011). Also, the seasonal distribution of rainfall determines the microbial activity in cerrado soils with an N-NO₃⁻ accumulation for short periods after the first rain events and subsequent immobilization (Nardoto and Bustamante, 2003). However, evidence of ecological determinants of the potential fixation activity of microbial groups in the Cerrado soils under native vegetation is quite scarce. To understand the potential impacts of nutrient additions and liming under N₂ fixation in cerrado soils, we investigate how it could affect the abundance of *nifH* genes in soils from a long-term fertilization experiment in a natural area of Cerrado.

Box 1 The nitrogen cycle: a complex set of reactions performed almost exclusively by microbial enzymes

Nitrogen is a highly dynamic element in nature, occurring in different chemical forms that are strongly influenced by environmental oxidative and reductive conditions. The N biogeochemical cycle (Fig. 1) involves a high number of chemical transformations catalyzed by a wide variety of microbial enzymes (Correa-Galeote et al., 2014). In soil, the N cycle integrates dissimilative, assimilative, and decomposition processes (Levy-Booth et al., 2014). Briefly, N-fixing microbial communities that express the nitrogenase enzyme, encoded by the *nifH* gene, reduced the N₂ present in the atmosphere to NH₄⁺ in a dissimilatory process. The available NH₄⁺ can pass through two metabolic routes: 1) the dissimilatory pathway in which NH₄⁺ is transformed into hydroxylamine (NH₂OH) by the activity of the enzyme ammonia monooxygenase (encoded by the *amoA* gene) present in ammonium oxidizing bacteria and archaea, or 2) the immobilization by plants and microorganisms in an assimilatory process of N-NH₄⁺. In the dissimilatory processes, the NH₂OH is quickly oxidized to NO₂⁻ by microorganisms that express the *hao* gene, which encodes a hydrazine oxidase associated with nitrification (includes the nitrification and nitrification) and also with the *anammox* process. Following the metabolic pathway of nitrification, the NO₂⁻ can be oxidized to NO₃⁻ by a nitrate oxidoreductase synthesized by microbial communities that express *nxr* genes. Plants or microorganisms assimilate the NO₃⁻ or it can be directly reduced to NH₄⁺ by the dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), or even return to NO₂ in another dissimilatory reduction process when the *napA* or *narG* genes are expressed. These genes encode nitrate reductases involved in the initial stage of denitrification. NO₂ (from the dissimilatory reduction process or generated in the nitrification stage) can return to NH₄⁺, be directly reduced to gaseous forms, or pass through the *anammox* process before being

reduced to N_2 . Nitrite reductases encoded by the *nirA* gene catalyzes the reduction of NO_2^- to NH_4^+ . The reduction of NO_2^- to the gaseous form NO involves nitrite reductases encoded by genes such as *nirS* and *nirK*. The *norB* genes encode nitric oxide reductases that catalyze the NO reduction to N_2O , and the *nosZ* gene encodes nitrous oxide reductases that catalyze the N_2O conversion to N_2 . In the anammox process, either NH_4^+ or NO_2^- which has undergone the partial nitrification process or resulting from the dissimilar reduction of NO_3^- can be converted to hydrazine (N_2H_4) and then to N_2 from the activity of a hydrazine oxidoreductase, encoded by *hzo* gene. In assimilative pathways, the $N-NH_4^+$ or $N-NO_3^-$ are immobilized by microbes and plants. The element N can return to the cycle through decomposition. The organic nitrogen compounds (N_{org}) are degraded during the litter decomposition and can be immobilized again by plants or microorganisms. The N_{org} could also be mineralized into NH_4^+ , continuing the cycle. The N_{org} mineralization or ammonification can be catalyzed by several other enzymes, such as chitinase, encoded by the *chiA* gene.

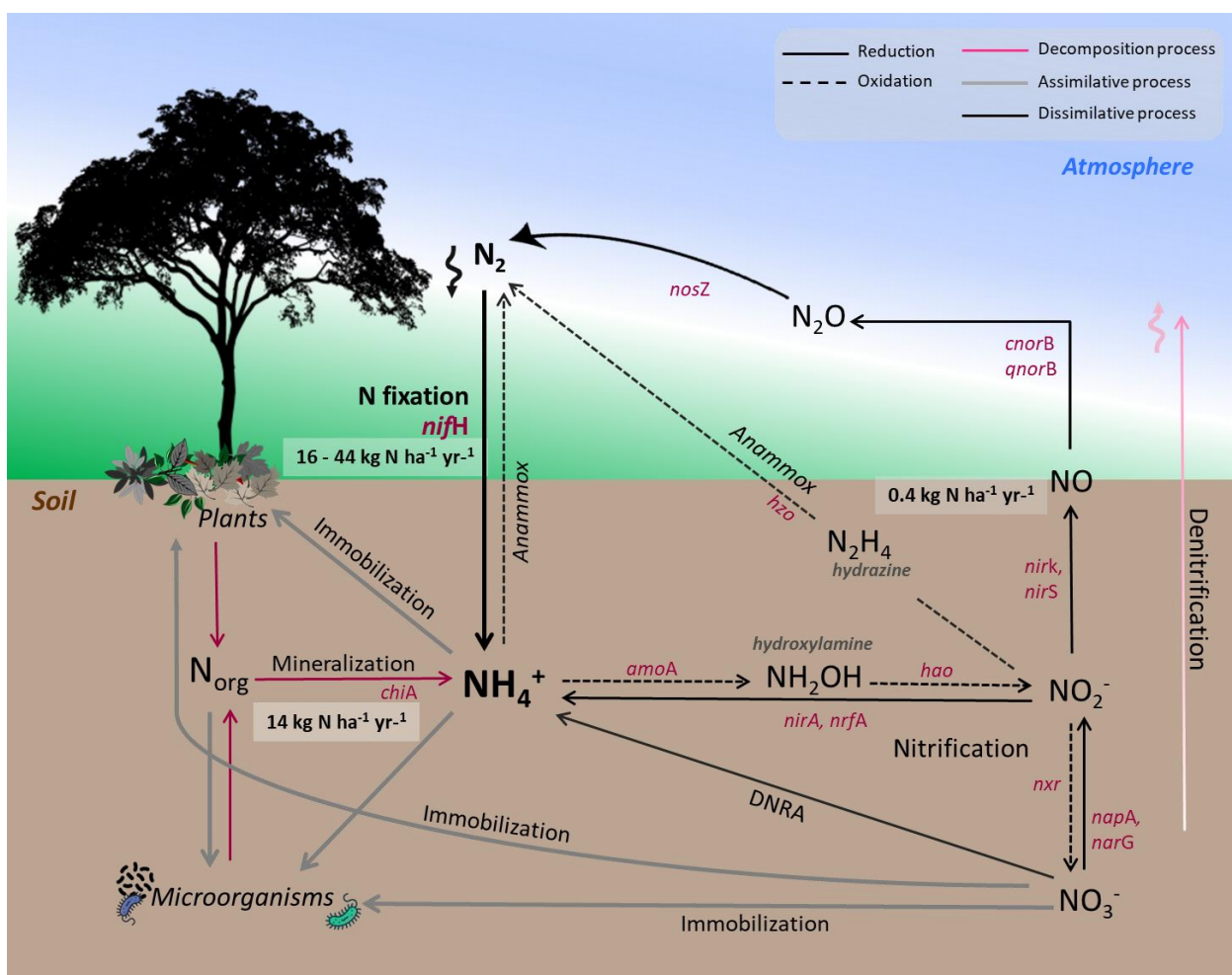


Fig. 1 Schematic representation of major pathways in the N cycle occurring in the atmosphere-soil interface. The microbial genes involved in each step are indicated. The values in the figure represent the fluxes in the N budget measured for the cerrado *sensu stricto* described in a review by Bustamante et al. (2006). *Anammox*, anaerobic ammonia oxidation; DNRA, dissimilatory nitrate reduction to ammonium; N_{org} , organic nitrogen.

MATERIAL AND METHODS

Experimental area

The study was conducted in a long-term nutrient addition experiment (Kozovits et al., 2007), situated inside a preserved area on Roncador Ecological Reserve in the Brazilian Institute of Geography and Statistics (Reserva Ecológica do IBGE, Recor IBGE), in Brasília, Federal District, Brazil (15°56'S, 47°53'W). The reserve is located in the Cerrado biome. The study area is a typical cerrado, plant formation characterized by continuous herbaceous layer vegetation associated with a shrubby-arboreal layer (Ribeiro and Walter, 2008). The soil in the area is a Red Latosol (Brazilian Soil Taxonomy System; Haridasan 1994; EMBRAPA 1999), deep, old, clayey, acidic, with high levels of aluminum and low cation exchange capacity (Motta et al., 2002; Reatto et al., 2008; Ribeiro and Walter, 2008). According to the Köppen classification, the climate is categorized as AW, with a well-defined rainy and dry season (October to April, May to September, respectively). The wet period comprises about 90% of the annual rainfall, with an average of around 1,500 mm and warmer temperatures (Silva et al., 2008).

The experiment was implemented in 1998 with biannual fertilizer additions (by hands) at the transition period between rainy and dry season until 2006 (Jacobson et al., 2011; Simpson Junior, 2002). The experiment is composed of five treatments consisting of **1)** Control: without nutrient addition; **2)** N treatment: addition of 100 kg/ha per year of nitrogen in the form of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄); **3)** P treatment: addition of 100 kg/ha per year of simple superphosphate 20% - Ca(H₂PO₄)₂ + CaSO₄.2H₂O; **4)** N+P treatment: addition of 100 kg/ha per year of ammonium sulfate together with 100 kg/ha per year simple superphosphate 20%; and **5)** Liming or liming treatment: addition of 4 t/ha per year of 60% dolomitic limestone (CaO+MgO) + 40% agricultural plaster (CaSO₄.2H₂O). Each treatment consists of four 15 x 15 m plots randomly distributed with a minimum distance of 10 m between them. Each plot is subdivided into nine subplots (5 x 5m). After 11 years without any chemical fertilizer addition, the experimental additions were resumed in November 2017, applying half of the dose previously described, and conducted out twice in the following year, except in liming treatment that received only the first chemical addition.

Soil sampling

Soil samples (0-10 cm depth) were randomly collected in five different subplots per plot during the rainy (March) and dry (August) seasons of 2018. The five samples per plot were composed (avoiding roots) into a single representative sample of each of the four plots per treatment. Subsamples for molecular analyses were immediately frozen into liquid nitrogen in the field and then, stored in -80°C until downstream procedures. For the chemical analysis, the composed samples were sieved in a 2 mm mesh.

Soil chemical and physical properties

Soil collected in the rainy season were analyzed for Ca, Mg, Al, K, available P (Mehlich I), and pH (water at 1:2.5) according to EMBRAPA protocols (Embrapa, 1997). Total carbon (TC) and nitrogen (TN) contents were determined by combustion of samples under continuous helium flow, in an elemental analyzer (Carlo Erba, CHN - 1110) coupled to the mass spectrometer Thermo Finnigan Delta Plus. For soils from rainy and dry seasons, the N-NO_3^- determination was carried out directly by UV-absorption at 218 nm, 228 nm, 254 nm, and 280 nm (Meier, 1991). The N-NH_4^+ content was determined by colorimetric reaction with the Nessler reagent at 425 nm. The soil moisture was determined by oven drying samples at 105°C to constant weight. The soil temperature at 10 cm was evaluated *in situ* using Digi-Sense® thermometer.

DNA extraction, PCR, cloning and sequencing

Metagenomic DNA was extracted in duplicates from 0.5g of soil with the FastDNA® Spin kit (MP Biomedicals), following the manufacturer's protocol. An additional purification step was performed using PowerClean® DNA Clean-Up kit (Mo Bio Laboratories, Inc.). The DNA quality and quantity were evaluated in a Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. The 16S rRNA and *nifH* genes were amplified in a first PCR round using the primer set 515F/806R and *nifH*-F/*nifH*-R, respectively (Table 1). For both genes, the amplification was performed in a 20 µl PCR reaction mixture containing 1X PCR buffer, 2.0 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP mix, 0.2 mM of each oligonucleotide primer, 0.5U Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 1.0 µg of DNA template. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 30 cycles at 95°C for 60 s, annealing at 55°C (16S rRNA gene) or 63°C (*nifH*) for 60s, 72°C for 60 s, and the final extension at 72°C for 7 min.

The 16S rRNA and *nifH* PCR products were excised from 0.8% agarose gels and purified using PureLink Quick Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). After quantification on nanodrop, 100 ng of the purified 16S rRNA and *nifH* amplicons were cloned into a pGEM-T Easy cloning vector (Promega; Madison, WI) according to manufacturer's protocols and transformed into *E. coli* DH5α competent cells by heatshock method. Transformant colonies were inoculated into selective LB medium (100 µg/µL, ampicillin) and incubated at 37 °C for 16 hours. Plasmid extraction was performed by alkaline lysis method (Sambrook 2001) and the presence of the insert checked by digestion with EcoRI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA). Positive plasmids were sequenced using the Sanger method to confirm gene sequence and annotation.

After genes sequence confirmation, we performed the design and synthesis of non-degenerate 16S and *nifH* primers to reduce possible bias in the qPCR results (Gaby and Buckley, 2017). The new primers design and T_m calculation were conducted in the Geneious software 10.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) based on genes sequence generated by Sanger sequencing and are described in Table 1.

Taxonomic links

The obtained *nifH* gene sequences were analyzed for quality using the PHRED algorithm (Ewing et al., 1998), using the Electropherogram quality analysis tool available on the EMBRAPA website: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. The cloned sequence that showed a PHRED value greater than 20 with at least 350 nucleotides was selected. The taxonomic identity of *nifH* cloned fragment was conducted based on the ten significant alignments (> 200 bp) optimized for highly similar sequences on BLASTN based on the Nucleotide collection (nt) database (Mogulis et al. 2008; Zhang et al. 2000).

We have filtered out our previous taxonomic data set based on Illumina sequencing of the 16S rRNA gene (described in Chapters 1 and 2) to generate a heat-tree of the taxonomic diversity of the Proteobacteria. The Proteobacteria representation choice was considered because this phylum includes a large number of N-fixing bacteria, and it is present in elevated abundance in Cerrado soils, including our soil samples. Also, the most representative *nifH* gene sequence in the present study was annotated inside this group (see Results section). From the Proteobacteria dataset, we compute a hierarchical heat tree with taxonomic diversity (class, order, family, and genera) based on the log 2 ratio of the median proportions using the metacoder package in R (Foster et al., 2017). The comparisons were carried out among treatments of nutrient additions for each season.

Quantitative PCR (qPCR)

The quantitative PCR (qPCR) method was used to quantify the *nifH* gene relative abundance (biological N fixation potential) from soil samples (0-10 cm) using the primers set *nifH*-1F/*nifH*1-R (Table 1). The 16S rRNA gene abundance was estimated as the reference gene in samples using the primer set 16S-R1F/16S-R1R (Table 1). Dilution series of cloned fragments representing each gene (*nifH* and 16S rRNA) and containing known quantities of DNA copies (between 3.0×10^2 and 3.0×10^9) were employed in the qPCR reaction to generate the standard curves. The qPCR was performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Life Technologies). qPCR assays were carried out in triplicates contained 5 µl of 1X Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 mM of each oligonucleotide primer, 1.0 µg of DNA template. PCR-grade water was used as a negative control. The PCR conditions for both, *nifH* and 16S rRNA genes were as follows: 2 min at 50°C, 2 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 3 s and annealing at 60°C for 30 s. The melt curve protocol was 95°C for 15 s, 60°C for 60 s and 95°C for 15 s. Product specificity was confirmed by melt curve. Data were analyzed by relative quantification using the comparative C_T (threshold cycle) method and presented as fold change in gene quantification related to untreated control plots. The calibrated normalized relative quantities (CNRQ values) were generated in the qbase+ software version: 3.2.

Statistical analysis

Spearman's correlation was used to test the association between soil moisture and soil temperature variables. Seasonal and treatment effects on relative quantities of *nifH* gene were evaluated by two-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer HSD test for multiple comparisons ($p < 0.05$). Significant differences in

gene relative counts were determined using the log-transformed data. All the statistical analysis was performed in R software.

Table 1 Primer sets used to amplification of 16S rRNA and *nifH* genes from soil samples (0-10 cm) in a long-term nutrient addition experimental area in cerrado, Brasília, Brazil.

| | Primer sequence | Amplicon length | Reference |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------|
| 16S rRNA | | | |
| 515F | 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' | ~390 bp | (Apprill et al., 2015; |
| 806R | 5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3' | | Parada et al., 2016) |
| 16S-R1F | 5'-GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT-3' | ~108 bp | In the present study |
| 16S-R1R | 5'-ATCCTGTTTGTCTCCCCACG-3' | | |
| <i>nifH</i> gene | | | |
| nifH-F | 5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3' | ~432 bp | (Rosch et al., 2002) |
| nifH-R | 5'-TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT-3' | | |
| nifH-1F | 5'- TGTGGCGGCATACATGGC-3' | ~130 bp | In the present study |
| nifH-1R | 5'- TCACCTCGATCAACTTCTGG-3' | | |

RESULTS

Soil parameters

Soil moisture (37.6% and 24.3%) and temperature (22.2 °C and 18.4 °C) were positively correlated (Spearman's correlation, $R = 0.74$, $p < 0.001$) and, both variables decreased from the rainy to the dry season (Fig. 2). The inorganic N content ($N-NO_3^-$ and $N-NH_4^+$) also showed marked seasonal variation, with decreasing concentrations from rainy to the dry season in all treatments (Table 2). The soil pH showed less seasonal variation but was strongly affected by the treatments. In comparison with the control treatment, there was an increase in soil pH in the liming treatment (control vs. liming - rainy: 4.67 vs. 6.11; dry: 4.00 vs. 6.27), N (rainy: 3.76; dry: 3.64), NP (rainy: 3.73; dry: 3.95) and P treatments (rainy: 3.73; dry: 3.95) (Table 2).

Other soil chemical properties such as TC, TN, and concentrations of available P, K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Al^{3+} were determined during the rainy season (Table 2). The TC varied between 3.66% in control and 3.40% in N treatment. The maximum TN percentual was 0.20% in NP, and the minimum was 0.17% in liming treatment. The CN ratios means varied between 20.42 in liming and 18.54 in N plots. We observed almost three-fold reduction in available P content in liming plots and an increased about four-fold in the NP and P treatment (control: 1.70 vs. liming: 0.65; N: 1.28; NP: 6.98; P: 6.60 mg/dm³). The K content decreased approximately three-fold in the liming treatment compared to control plots (control: 28.75 vs. liming: 10.75 mg/dm³), while Mg^{2+} (control: 0.11 vs. liming: 4.69 cmol_c/dm³) and Ca^{2+} (control: 0.19 vs. liming: 4.69 cmol_c/dm³) increased about 25-fold in the liming treatment (Table 2). The Al^{3+} contents were zero in the Ca treatment (control: 0.94 vs. liming: 0.00 cmol_c/dm³) but increased in the NP treatment (1.46 cmol_c/dm³) compared with control plots (Table 2).

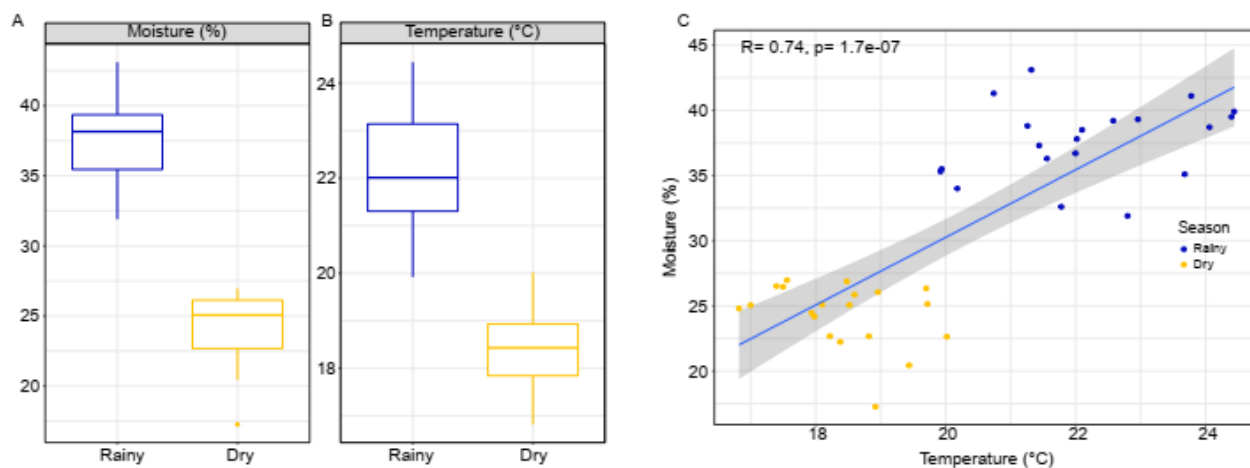


Fig. 2 Soil moisture **(a)** and temperature variation **(b)** between rainy and dry seasons of 2018 and Spearman's correlation between soil moisture and temperature **(c)**. Soils (0 – 10 cm depth) were collected in a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil.

Table 2 Chemical properties of soil (0-10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected in a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error (n = 4).

| Variable | Rainy season | | | | | Dry season | | | | |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Control | Ca | N | NP | P | Control | Ca | N | NP | P |
| pH (H ₂ O) | 4.67 \pm 0.21 | 6.27 \pm 0.11 | 3.76 \pm 0.07 | 3.73 \pm 0.11 | 4.08 \pm 0.08 | 4.00 \pm 0.09 | 6.11 \pm 0.09 | 3.64 \pm 0.04 | 3.95 \pm 0.30 | 3.73 \pm 0.08 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 2.27 \pm 0.25 | 2.22 \pm 0.62 | 2.18 \pm 0.61 | 1.64 \pm 0.54 | 2.60 \pm 0.61 | 1.61 \pm 0.14 | 1.73 \pm 0.30 | 0.88 \pm 0.18 | 1.04 \pm 0.72 | 1.37 \pm 0.26 |
| N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 25.13 \pm 8.95 | 24.37 \pm 7.13 | 43.78 \pm 15.02 | 96.43 \pm 66.24 | 37.04 \pm 25.21 | 9.02 \pm 1.16 | 8.32 \pm 1.35 | 6.58 \pm 0.41 | 8.44 \pm 2.17 | 6.68 \pm 0.19 |
| TN (%) | 0.19 \pm 0.02 | 0.17 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.02 | 0.20 \pm 0.02 | 0.19 \pm 0.02 | - | - | - | - | - |
| TC (%) | 3.66 \pm 0.60 | 3.46 \pm 0.15 | 3.40 \pm 0.49 | 3.64 \pm 0.36 | 3.65 \pm 0.37 | - | - | - | - | - |
| C:N | 18.85 \pm 0.87 | 20.42 \pm 0.28 | 18.65 \pm 0.38 | 18.54 \pm 0.29 | 19.02 \pm 0.41 | - | - | - | - | - |
| P (available, mg/dm ³) | 1.70 \pm 0.36 | 0.65 \pm 0.33 | 1.28 \pm 0.13 | 6.98 \pm 2.86 | 6.60 \pm 2.67 | - | - | - | - | - |
| K (mg/dm ³) | 28.75 \pm 6.18 | 10.75 \pm 1.89 | 22.75 \pm 3.40 | 28.50 \pm 3.32 | 26.75 \pm 2.50 | - | - | - | - | - |
| Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.11 \pm 0.03 | 2.73 \pm 0.15 | 0.08 \pm 0.01 | 0.13 \pm 0.08 | 0.10 \pm 0.02 | - | - | - | - | - |
| Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.19 \pm 0.05 | 4.69 \pm 0.20 | 0.15 \pm 0.02 | 0.40 \pm 0.17 | 0.30 \pm 0.06 | - | - | - | - | - |
| Al ³⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.94 \pm 0.17 | 0.00 \pm 0.00 | 1.38 \pm 0.15 | 1.46 \pm 0.14 | 1.07 \pm 0.24 | - | - | - | - | - |

Control – untreated control; liming: liming; N: nitrogen addition; NP: nitrogen and phosphorus addition; P: phosphorus addition. TC: total carbon; TN: total nitrogen.

Taxonomy characterization of *nifH* gene and 16S rRNA taxonomic links

The BLAST nucleotide alignment result showed that the *nifH* gene sequence recovered from cloned fragment was classified in the Proteobacteria cluster, comprising sequences most closely related to *Bradyrhizobium* members (over 93% identical; Table S1).

The taxonomy tree based on the previously filtered out 16S rRNA database (see chapter 1) for the Proteobacteria community showed a strong difference in the abundance of Proteobacteria members between the NP treatment compared to untreated control during the rainy season (Fig. 3). Other differences were observed on Proteobacteria members abundance on P treatment compared to N or liming treatment, and in liming compared with NP (Fig. 3). During the dry season, the abundances of Proteobacteria members differed mainly in the comparisons between liming versus all treatments, including the control plots, with lesser differences in the other pair-wise comparisons (Fig. 3). Taxonomic groups inside Proteobacteria phylum comprised the genera *Rhodoplanes*, *Methylovirgula*, *Rhodomicrobium*, *Roseiarcus*, *Pedomicrobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and many others affiliated to Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Deltaproteobacteria classes represented in Fig. 3.

Seasonal and nutrient addition effects on microbial N fixation potential

The relative abundance of the *nifH* gene was affected by the seasonality of precipitation ($p < 0.001$) (Fig. 4). The relative quantities of the *nifH* gene counted over four-fold higher during the rainy season in the control plot ($p < 0.001$), and more than two-fold increase in the N ($p < 0.01$) and NP ($p < 0.001$) plots during the same sampling period.

During the rainy season, the *nifH* gene relative quantities decreased about ten and two-fold in the liming ($p < 0.001$) and P ($p < 0.05$) treatments compared to control plots, respectively (Fig. 4). Also, the *nifH* gene counts were about six-fold lower in the liming treatment compared to N and NP treatments ($p < 0.001$), and about four-fold lower than the relative counts in P treatment ($p < 0.001$). There were no differences in *nifH* relative quantities in the N and NP treatments compared to control ($p > 0.05$). In the dry season, the relative amount of *nifH* decreased about four-fold in liming treatment compared to control ($p < 0.001$). Over again, the liming treatment showed lower *nifH* counts than N, NP, and P treatments (between four and five-fold lower; $p < 0.001$). There were no differences between these last three treatments and control plots ($p > 0.05$).

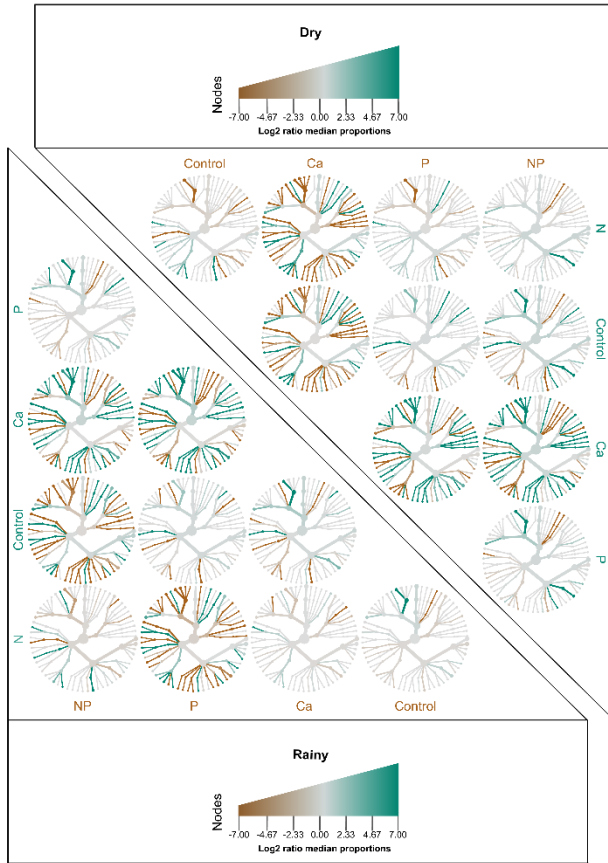


Fig. 3 A hierarchical taxonomy of Proteobacteria members obtained from 16S rRNA gene in the soil samples (0 - 10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. The grey tree on the right represents a key for the unlabeled trees. Each of the smaller trees represents a comparison among the treatments in the columns and rows. Node size represents the relative proportions for that taxon. A taxon colored brown is more abundant in treatment in the column, and a *taxon* colored green is more abundant in treatment of the row. Control – untreated control; liming: liming; N: nitrogen addition; NP: nitrogen and phosphorus addition; P: phosphorus addition.

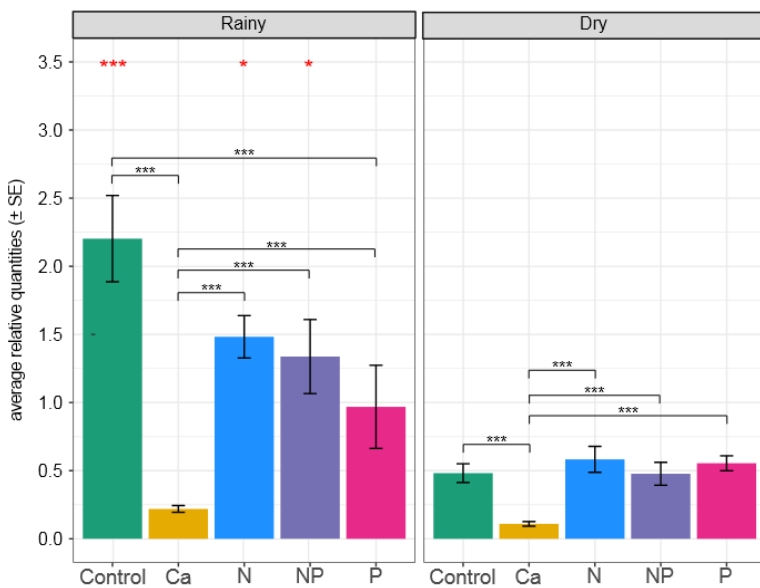


Fig. 4 Relative quantities of *nifH* gene in the soil samples (0 – 10 cm depth) collected in the rainy and dry seasons of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brazil. Control – untreated control; Ca: liming; N: nitrogen addition; NP: nitrogen and phosphorus addition; P: phosphorus addition.

DISCUSSION

The soil microbial component constitutes the basis for terrestrial ecosystem functioning. Here, we report a comprehensive *nifH* gene evaluation as a proxy to depict the interactive effects between precipitation and the long-term nutrient addition on N-fixing activity by diazotrophic soil community. Firstly, the phylogenetic characterization of the *nifH* cloned fragment indicated the sequence taxonomy identity related to *Bradyrhizobium* members (Table S1). The genus *Bradyrhizobium* comprises a group of N-fixing rhizobia in Proteobacteria that could be called generalists with versatile metabolism and ecological relationships. For example, they can include plant-interactive or free-living microorganism species (Kahindi et al. 1997; Elsas et al. 2019). In the present study, we evaluated *nifH* DNA sequences from bulk soil and presumed the *nifH* gene sequence to belong to the putative non-symbiont diazotrophic community. Previous studies in soils under tropical rainforest in Costa Rica (Reed et al., 2010) and in the Amazon (Reed et al., 2010) also have reported *nifH* clone sequences associated with free-living or associative Alphaproteobacteria. They included the genera *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, and others.

The taxonomic diversity of the Proteobacteria community has shown differences in the abundance of Proteobacteria members between treatments in the rainy and dry seasons (Fig. 3). These are the first evidence of the potential effects of nutrient addition-promoting shifts in many diazotrophic bacteria inside Proteobacteria phylum, or even in diazotrophic microorganisms affiliated with other taxonomic groups in tropical savannas. These changes could also be associated with the decrease in *nifH* gene counts (presumably negative effect in N fixation, Fig. 4) in the treated plots, revealing the potential reduction in the microbial N-fixing process promoted by nutrient additions.

In general, *nifH* quantities were relatively lesser in all nutrient addition plots, with more pronounced differences in the comparisons with the liming treatment (Fig. 4). The greatest inhibitory effects on *nifH* gene copy numbers in the liming plots could be related to the combined changes in soil chemical parameters (Han et al., 2019), since environmental conditions strictly controls the nitrogenase enzyme (Han et al., 2019; Huergo et al., 2012; Poly et al., 2001). The major environmental change promoted by liming into soils was the pH increase resulting in higher concentrations of exchangeable Ca^{2+} and Mg^{2+} and concomitant decreasing in K^+ and available P levels and immobilization of Al^{3+} (Table 2). A previous evaluation of soil changes in the experimental plots indicated a reduction of about three-fold in Fe contents in the liming treatment, even after nine years without new additions to the soil (Mello 2019). Iron represents a critical element to the nitrogenase proteins complex (Gaby and Buckley, 2011; Zehr et al., 2003), which could be extensively demanded by diazotrophs (Larson et al., 2018; Mills et al., 2004). Although studies including the interactive effects among environmental controls on free-living N-fixing are scarce, a long-term fertilization experiment with acidic Ultisol in a subtropical monsoon climate region in China made similar observations (Lin et al., 2018). The researchers found a sharp decrease in *nifH* gene abundance in plots under NPK plus lime fertilization, which was associated with the increase in soil pH. Also, shifts in microbial community

structure replaced the dominant *Bradyrhizobium* genus by *Azohydromonas* in the treatment submitted to lime addition (Lin et al., 2018).

In our study, the *nifH* gene counts were also reduced in P treatment during the rainy season (Fig. 4). The significant changes in this treatment included the increase in P available content and the slight reduction in pH (Table 2). Several studies highlighted the importance of P availability to N cycling in tropical and temperate savannas (see Bustamante et al. 2006 for a review). The available P contents are described as a limiting factor to N fixation in tropical P deficient soils (Bustamante et al., 2006; Van Langenhove et al., 2019) and could be critical to activate genes for the nitrogenase synthesis (Stock, 1990). However, although the relationship between the increase in P availability with increasing N fixation, the free-living diazotrophs could perform BFN in a broader range of phosphorus supply or accessibility than symbionts (Smercina et al., 2019), suggesting other controls to *nifH* abundance in our soils.

In a review about the pivotal players controlling nitrogenase activity, Huergo et al. (2012) highlight the evolved mechanisms in diazotrophs to shut-down N fixation when NH_4^+ is available in the environment to avoid energy wastage during the N_2 reduction in BFN process. Ammonium was the main driver of the *nifH* gene variation across different agricultural soils (Pereira e Silva et al., 2013). Here, the *nifH* counts seemed to be negatively affected in plots with higher N- NH_4^+ concentrations, but also in the liming treatment, where N- NH_4^+ showed a minor variation in comparison with the control (Fig. 4; Table 2). This result reinforces the understanding that *nifH* gene quantities could be more determined by long-term interactive effects in soil chemistry and biological components than by the influence of a single variable.

The temporal dynamics of non-symbiotic N-fixing in Cerrado soils is poorly understood. Our analysis of *nifH* relative quantities indicated a strong influence of the precipitation's seasonal distribution on *nifH* abundances. The seasonal modulation in *nifH* counts may be associated with a high decrease in the soil moisture and temperature during the dry season (Fig. 1). The *nifH* gene counts decrease in control, N, and NP plots in the dry season (Fig. 4). Lower soil water content could promote greater oxygen diffusion across soil aggregates (Kirk, 2004), increasing aerobic conditions that represent an important inhibitor of nitrogenase activity (Fay, 1992; Norman and Friesen, 2017). Also, aerobic conditions demand substantial energy investments in nitrogenase protection in free-living soil diazotrophs (Norman and Friesen, 2017). Some diazotroph bacteria could even cease nitrogenase production in the presence of high oxygen levels (Hill 1988; Reed et al. 2011; Bruijn 2015).

Overall, the ecological insights into N-fixing generated here, indicated that the increase in nutrient availability and soil pH could negatively affect *nifH*. In contrast, the higher moisture levels in the rainy period seemed to contribute with the greatest *nifH* relative proportions. Future investigations need to be performed to include the evaluation of the *nifH* expression and high-throughput sequencing analysis to link N-fixing rates to specific diazotrophs taxa. However, our results already represent a substantial advance of the knowledge on non-symbiotic N-fixing in Cerrado, the impacts of seasonality, and soil changes on microbial functional traits in savannas.

REFERENCES

- Aislabie, J., Deslippe, J.R., Dymond, J.R., 2013. Soil microbes and their contribution to soil services, in: Dymond, J.R. (Ed.), *Ecosystem Services in New Zealand - Conditions and Trends*. Mannaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, pp. 143–161.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L., 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 75, 129–137. doi:10.3354/ame01753
- Araujo, J.F., Castro, A.P. De, Costa, M.M.C., Togawa, R.C., Handelsman, J., Krüger, R.H., 2012. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-012-0057-3
- Belmok, A., Rodrigues-Oliveira, T., Lopes, F.A.C., Miranda, H.S., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2019. Long-term effects of periodical fires on archaeal communities from Brazilian Cerrado soils. *Archaea* 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/6957210
- Bernhard, A., 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3, 25.
- Bond, W.J., Woodward, F.I., Midgley, G.F., 2004. The global distribution of ecosystems in a world without fire. *New Phytologist* 165, 525–538. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01252.x
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2647–53.
- Boyd, E.S., Peters, J.W., 2013. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00201
- Bresolin, J.D., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., Silva, M.R.S.S., Perez, K.S., 2010. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 391–403.
- Brookshire, E.N.J., Wurzbarger, N., Currey, B., Menge, D.N.L., Oatham, M.P., Roberts, C., 2019. Symbiotic N fixation is sufficient to support net aboveground biomass accumulation in a humid tropical forest. *Scientific Reports* 9, 7571. doi:10.1038/s41598-019-43962-5
- Bruijn, Frans J. (ed). 2015. *Biological nitrogen fixation*. Vol.2. New Jersey: Wiley Blackwell. ISBN: 978-1-118-63707-4
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Campanello, P.I., Villalobos-Vega, R., Bustamante, M., Miralles-Wilhelm, F., 2006. Nutrient availability constrains the hydraulic architecture and water relations of savannah trees. *Plant, Cell and Environment* 29, 2153–2167. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01591.x
- Bushnell, B., 2014. BBMap short read aligner. doi:DE-AC02-05CH11231
- Bustamante, M.M.C., Medina, E., Asner, G.P., Nardoto, G.B., Garcia-Montiel, D.C., 2006. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79, 209–237. doi:10.1007/s10533-006-9006-x
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11, 2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119
- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G., 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192–196.
- Cardenas, E., Tiedje, J.M., 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 544–549. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.010
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F., Pedros-Alio, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4, 338–348. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x
- Catão, E., Castro, A.P., Barreto, C.C., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2013. Diversity of Archaea in Brazilian savanna soils. *Archives of Microbiology* 195, 507–512. doi:10.1007/s00203-013-0882-x
- Catão, E., Lopes, F., Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M., Kruger, R.H., 2014. Diversity and Function of Bacterial Assemblages in Savanna Vegetation Soils, in: Maheshwari, D. (Ed.), *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*. Springer, pp. 147–165. doi:10.1007/978-3-319-05936-5_6
- Catão, E.C.P., Lopes, F. a C., Araújo, J.F., de Castro, A.P., Barreto, C.C., Bustamante, M.M.C., Quirino, B.F., Krüger, R.H., 2014. Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. *International Journal of Microbiology* 2014, 156341.

doi:10.1155/2014/156341

- Catão, E.C.P., Lopes, F.A.C., Rubini, M.R., Nardoto, G.B., Prosser, J.I., Krüger, R.H., 2016. Short-term impact of soybean management on ammonia oxidizers in a Brazilian savanna under restoration as revealed by coupling different techniques. *Biology and Fertility of Soils* 52, 401–412. doi:10.1007/s00374-015-1086-0
- Catão, E.C.P., Thion, C., Krüger, R.H., Prosser, J.I., 2017. Ammonia oxidisers in a non-nitrifying Brazilian savanna soil. *FEMS Microbiology Ecology* 93, 1–8. doi:10.1093/femsec/fix122
- Chapin, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., 2011. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*, 2nd ed. Springer, New York.
- Chen, C., Zhang, J., Lu, M., Qin, C., Chen, Y., Yang, L., Huang, Q., Wang, J., Shen, Z., Shen, Q., 2016. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* 52, 455–467. doi:10.1007/s00374-016-1089-5
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O., Perakis, S.S., Latty, E.F., Von Fischer, J.C., Elseroad, A., Wasson, M.F., 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13, 623–645. doi:10.1029/1999GB900014
- Correa-Galeote, D., Tortosa, G., Bedmar, E.J., 2014. Microbial Nitrogen Cycle: Determination of Microbial Functional Activities and Related N-compounds in Environmental Samples, in: Marco, D. (Ed.), *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications*. Caister Academic Press, Argentina, pp. 175–193.
- Cuevas-Reyes, P., De Oliveira-Ker, F.T., Fernandes, G.W., Bustamante, M., 2011. Abundance of gall-inducing insect species in sclerophyllous savanna: understanding the importance of soil fertility using an experimental approach. *Journal of Tropical Ecology* 27, 631–640. doi:10.1017/S0266467411000368
- Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., Brözel, V.S., 2017. Diversity of free-living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological Research* 195, 31–39. doi:10.1016/j.micres.2016.11.004
- de Araujo, A.S.F., Bezerra, W.M., dos Santos, V.M., Rocha, S.M.B., Carvalho, N. da S., de Lyra, M. do C.C.P., Figueiredo, M. do V.B., de Almeida Lopes, Â.C., Melo, V.M.M., 2017. Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 110, 457–469. doi:10.1007/s10482-016-0815-1
- de Carvalho, T.S., Jesus, E. da C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M. de S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology* 97, 2760–2771. doi:10.1002/ecy.1513
- de Mello, T.R.B., Munhoz, C.B.R., Bustamante, M.M.C., 2014. Effects of nutrient additions on the diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado), in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Sheppard, L.J., Sverdrup, H., Haeuber, R., Hicks, W.K. (Eds.), *Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, pp. 147–154. doi:10.1007/978-94-007-7939-6_16
- Eiten, G., 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38, 201–341.
- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. *Manual de métodos de análise de solo*, 2nd ed. Embrapa-CNPq. Documentos,1, Rio de Janeiro.
- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília: Embrapa Produção de Informações, 1999. 412p.
- Espíndola, S.P., Bobuřská, L., Ferreira, A. de S., 2018. Impact of nitrogen additions on soil microbial respiration and temperature sensitivity in native and agricultural ecosystems in the Brazilian Cerrado. *Journal of Thermal Biology* 75, 120–127. doi:10.1016/j.jtherbio.2018.06.005
- Ewing, B., L. Hillier, M. Wendl, and P. Green., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*.I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., 2008. Ameliorating Soil Acidity of Tropical Oxisols by Liming For Sustainable Crop Production. pp. 345–399. doi:10.1016/S0065-2113(08)00407-0
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
- Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 340–373.
- Fernandes Cruvinel, Ê.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., Zepp, R.G., 2011. Soil emissions of NO, N₂O and CO₂ from croplands in the savanna region of central Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 29–40.

doi:10.1016/j.agee.2011.07.016

- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 357. doi:10.1073/pnas.0507535103
- Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Rütting, T., 2019. Evolution of nitrogen cycling in regrowing Amazonian rainforest. *Scientific Reports* 9, 8538. doi:10.1038/s41598-019-43963-4
- Foster, Z.S.L., Sharpton, T.J., Grünwald, N.J., 2017. Metacoder: an R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology* 13, e1005404. doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- HARIDASAN, M., 1994. Solos do Distrito Federal. p. 321-344. In: Novaes-Pinto M. (ed.) *Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas – O caso do Distrito Federal*. 2ed. Editora da Universidade de Brasília/SEMATEC, Brasília. 681p.
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2017. The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance. *Microbial Ecology* 74, 701–708. doi:10.1007/s00248-017-0968-0
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042149
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2011. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology* 13, 1790–1799. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02488.x
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Voesmer, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- Garofalo, C.R., 2001. Efeitos do aumento da disponibilidade de nutrientes na dinâmica de nutrientes em plantas lenhosas e solo em uma área de Cerrado stricto sensu. Universidade de Brasília.
- González-Pedraza, A.F., Dezzeo, N., 2014. Effects of Land Use Change and Seasonality of Precipitation on Soil Nitrogen in a Dry Tropical Forest Area in the Western Llanos of Venezuela. *The Scientific World Journal* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/514204
- Graham, J.E., Wantland, N.B., Campbell, M., Klotz, M.G., 2011. Characterizing Bacterial Gene Expression in Nitrogen Cycle Metabolism with RT-qPCR 1. Why Study Bacterial Transformation of Nitrogen is a key element of life and the competition for its acquisition, 1st ed, *Methods in Enzymology: Research on Nitrification and Related Processes Part B*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-386489-5.00014-2
- Gürtler, V., Stainisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16. doi:10.1099/13500872-142-1-3
- Han, L.-L., Wang, Q., Shen, J.-P., Di, H.J., Wang, J.-T., Wei, W.-X., Fang, Y.-T., Zhang, L.-M., He, J.-Z., 2019. Multiple factors drive the abundance and diversity of the diazotrophic community in typical farmland soils of China. *FEMS Microbiology Ecology* 95. doi:10.1093/femsec/fiz113
- Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20, 183–195. doi:10.1590/S1677-04202008000300003
- Hietz, P., Turner, B.L., Wanek, W., Richter, A., Nock, C.A., Wright, S.J., 2011. Long-Term Change in the Nitrogen Cycle of Tropical Forests. *Science* 334, 664–666. doi:10.1126/science.1211979
- Homeier, J., Báez, S., Hertel, D., Leuschner, C., 2017. Editorial: Tropical Forest Ecosystem Responses to Increasing Nutrient Availability. *Frontiers in Earth Science* 5. doi:10.3389/feart.2017.00027
- Huergo, L.F., Pedrosa, F.O., Muller-Santos, M., Chubatsu, L.S., Monteiro, R.A., Merrick, M., Souza, E.M., 2012. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. *Microbiology* 158, 176–190. doi:10.1099/mic.0.049783-0
- Hunke, P., Mueller, E.N., Schröder, B., Zeilhofer, P., 2015. The Brazilian Cerrado : assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use 1180, 1154–1180. doi:10.1002/eco.1573
- Isobe, K., Ohte, N., 2014. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* 29, 4–16. doi:10.1264/jsme2.ME13159
- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., 2019. Effects of nutrient addition on polyphenol and nutrient concentrations in leaves of woody species of a savanna woodland in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 35, 288–296. doi:10.1017/S0266467419000257

- Jacobson, T.K.B., Bustamante, M.M. da C., Kozovits, A.R., 2011. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution* 159, 2236–2242. doi:10.1016/j.envpol.2010.10.019
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.00744
- Kielak, A.M., Cretoiu, M.S., Semenov, A. V., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2013. Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 263–272. doi:10.1128/AEM.02546-12
- Klink, C. a., Machado, R.B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19, 707–713. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x
- Kozovits, A.R., Bustamante, M.M.C., Garofalo, C.R., Bucci, S., Franco, A.C., Goldstein, G., Meinzer, F.C., 2007. Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a neotropical savanna. *Functional Ecology* 21, 1034–1043. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01325.x
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil : Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.025
- Lammel, D.R., Barth, G., Ovaskainen, O., Cruz, L.M., Zanatta, J.A., Ryo, M., de Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2018. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. *Microbiome* 6, 106. doi:10.1186/s40168-018-0482-8
- Lannes, L.S., Bustamante, M.M.C., Edwards, P.J., Olde Venterink, H., 2016. Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. *Plant and Soil* 400, 231–243. doi:10.1007/s11104-015-2725-9
- Larson, C.A., Mirza, B., Rodrigues, J.L.M., Passy, S.I., 2018. Iron limitation effects on nitrogen-fixing organisms with possible implications for cyanobacterial blooms. *FEMS Microbiology Ecology* 94. doi:10.1093/femsec/fiy046
- Levy-Booth, D.J., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 11–25. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.021
- Lima, A.B., Cannavan, F. de S., Germano, M.G., Andreote, F.D., De, P.A.M., Franchini, J.C., Teixeira, W.G., Tsai, S.M., 2015. Effects of vegetation and seasonality on bacterial communities in Amazonian dark earth and adjacent soils. *African Journal of Microbiology Research* 9, 2119–2134. doi:10.5897/AJMR2015.7453
- Lima, J.E.F.W., Silva, E.M., 2008. Recursos hídricos do bioma Cerrado: importância e situação, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 90–106.
- Lin, Y., Ye, G., Liu, D., Ledgard, S., Luo, J., Fan, J., Yuan, J., Chen, Z., Ding, W., 2018. Long-term application of lime or pig manure rather than plant residues suppressed diazotroph abundance and diversity and altered community structure in an acidic Ultisol. *Soil Biology and Biochemistry* 123, 218–228. doi:10.1016/j.soilbio.2018.05.018
- Liu, D., Keiblinger, K.M., Leitner, S., Wegner, U., Zimmermann, M., Fuchs, S., Lassek, C., Riedel, K., Zechmeister-Boltenstern, S., 2019. Response of Microbial Communities and Their Metabolic Functions to Drying–Rewetting Stress in a Temperate Forest Soil. *Microorganisms* 7, 129. doi:10.3390/microorganisms7050129
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, W., Zhang, T., Chen, H., Mo, J., 2015. Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Scientific Reports* 5, 14378. doi:10.1038/srep14378
- Lynn, T.M., Liu, Q., Hu, Y., Yuan, H., Wu, X., Khai, A.A., Wu, J., Ge, T., 2017. Influence of land use on bacterial and archaeal diversity and community structures in three natural ecosystems and one agricultural soil. *Archives of Microbiology* 199, 711–721. doi:10.1007/s00203-017-1347-4
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Maron, P.A., Mougél, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus - Biologies* 334, 403–411. doi:10.1016/j.crv.2010.12.003
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* 17, 10. doi:10.14806/ej.17.1.200

- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Medina, E., 1993. Mineral nutrition: tropical savannas, in: Behnke, H.D., Lüttge, U., Esser, K., Kadereit, J.W., Runge, M. (Eds.), *Progress in Botany / Fortschritte Der Botanik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 237–253. doi:10.1007/978-3-642-78020-2_12
- Meier, M., 1991. Nitratbestimmung in boden-proden (N-min-methode), Labor Praxis. Berlin.
- Mello, T. R. B. 2019. Efeitos a médio e longo prazo da adição de nutrientes em áreas de cerrado típico sobre a vegetação herbáceo-arbustiva e interações acima e abaixo do solo. These. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Mills, M.M., Ridame, C., Davey, M., La Roche, J., Geider, R.J., 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* 429, 292–294. doi:10.1038/nature02550
- Mirza, B.S., Potisap, C., Nüsslein, K., Bohannon, B.J.M., Rodriguesa, J.L.M., 2014. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the amazon rainforest. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 281–288. doi:10.1128/AEM.02362-13
- Motta, P.E.F., Curi, N., Franzmeier, D.P., 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado, in: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical*. Columbia University Press, New York, pp. 13–33.
- Moura, K.S.P. de, 2019. Utilização de nitrato por *Telmatobacter* sp. AB60 Acidobacteria. Universidade Católica de Brasília.
- Myers, N., Myers, N., Mittermeier, R. a, Mittermeier, R. a, Fonseca, Gustavo a B, Fonseca, G a B, Kent, J., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–8. doi:10.1038/35002501
- Nardoto, G.B., Bustamante, M.M. da C., 2003. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 955–962. doi:10.1590/S0100-204X2003000800008
- Newton, W.E., 2007. Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation, in: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, Willian E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–129.
- Norman, J.S., Friesen, M.L., 2017. Complex N acquisition by soil diazotrophs: how the ability to release exoenzymes affects N fixation by terrestrial free-living diazotrophs. *The ISME Journal* 11, 315–326. doi:10.1038/ismej.2016.127
- Nottingham, A.T., Hicks, L.C., Ccahuana, A.J.Q., Salinas, N., Bååth, E., Meir, P., 2018. Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 54, 219–228. doi:10.1007/s00374-017-1247-4
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* 5, 787–797. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00476.x
- Oline, D.K., Schmidt, S.K., Grant, M.C., 2006. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. *Microbial Ecology* 52, 480–490. doi:10.1007/s00248-006-9101-5
- Oliveira-Filho, E.C. de, Lima, J.E.F.W., 2002. Potencial de Impacto da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região do Cerrado (No. 56), Documentos. Planaltina, DF. doi:ISSN: 1517-5111
- Oliveira, R.S., Bezerra, L., Davidson, E.A., Pinto, F., Klink, C.A., Nepstad, D.C., Moreira, A., 2005. Deep root function in soil water dynamics in cerrado savannas of central Brazil. *Functional Ecology* 19, 574–581. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01003.x
- Pajares, S., Bohannon, B.J.M., 2016. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–20. doi:10.3389/fmicb.2016.01045
- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* 18, 1403–1414. doi:10.1111/1462-2920.13023
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494
- Pearse, F., 2011. The Cerrado: Brazil's Other Biodiverse Region Loses Ground [WWW Document]. Yale School of Forestry & Environmental Studies.

- Pereira de Castro, A., Sartori da Silva, M.R.S., Quirino, B.F., da Cunha Bustamante, M.M., Krüger, R.H., 2016. Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLOS ONE* 11, e0148785. doi:10.1371/journal.pone.0148785
- Pereira e Silva, M.C., Schloter-Haj, B., Schloter, M., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2013. Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS ONE* 8, e74500. doi:10.1371/journal.pone.0074500
- Pinto, A. de S., 2002. Soil emissions of N₂O, NO, and CO₂ in Brazilian Savannas: Effects of vegetation type, seasonality, and prescribed fires. *Journal of Geophysical Research* 107, 8089. doi:10.1029/2001JD000342
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Monrozier, L.J., 2001. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2255–2262. doi:10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001
- Postgate J., 1998. *Nitrogen Fixation*, 3rd, Cambridge University Press, Cambridge UK, 1–112.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1641–1650. doi:10.1093/molbev/msp077
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35, 7188–7196. doi:10.1093/nar/gkm864
- Quirino, B.F., Pappas, G.J., Tagliaferro, A.C., Collevatti, R.G., Neto, E.L., da Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M.C., Krüger, R.H., 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research* 164, 59–70. doi:10.1016/j.micres.2006.12.001
- Rachid, C.T.C.C., Santos, A.L., Piccolo, M.C., Balieiro, F.C., Coutinho, H.L.C., Peixoto, R.S., Tiedje, J.M., Rosado, A.S., 2013. Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE* 8, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0059342
- Rampelotto, P.H., Ferreira, A. de S., Barboza, A.D.M., Roesch, L.F.W., 2013. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. *Microbial Ecology* 66, 593–607. doi:10.1007/s00248-013-0235-y
- Reatto, A., Correia, J.R., Spera, S.T., Martins, E.S., 2008. Solos do Bioma Cerrado: aspectos pedológicos, in: Sano, S.M., Almeida, S.P. de, Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 108–149.
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R., 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42, 489–512. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034
- Reed, S.C., Townsend, A.R., Cleveland, C.C., Nemergut, D.R., 2010. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia* 164, 521–531. doi:10.1007/s00442-010-1649-6
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 2008. As Principais fitofisionomias do bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 152–212.
- Rodrigues, T., Belmok, A., Catão, E., Kyaw, C.M., 2016. Archaea in Natural and Impacted Brazilian Environments. *Archaea* 2016, 1–14. doi:10.1155/2016/1259608
- Rosch, C., Mergel, A., Bothe, H., 2002. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3818–3829. doi:10.1128/AEM.68.8.3818-3829.2002
- Rughöft, S., Herrmann, M., Lazar, C.S., Cesarz, S., Levick, S.R., Trumbore, S.E., Küsel, K., 2016. Community composition and abundance of bacterial, archaeal and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.01638
- Santos, H.G. dos, Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C. dos, Oliveira, V.A. de, Oliveira, J.B. de, COELHO, M.R., Lumbrreras, J.F., Cunha, T.J.F., 2006. *Sistema brasileiro de classificação de solos*, 2nd ed. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Sarmiento, G., Goldstein, G., Meinzer, F., 1985. ADAPTIVE STRATEGIES OF WOODY SPECIES IN NEOTROPICAL SAVANNAS. *Biological Reviews* 60, 315–355. doi:10.1111/j.1469-185X.1985.tb00420.x
- Schimel, J.P., 2018. Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49, 409–432. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062614
- Scholz, F.G., Bucci, S.J., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Miralles-Wilhelm, F., 2007. Removal of nutrient limitations by long-term fertilization decreases nocturnal water loss in savanna trees. *Tree Physiology* 27, 551–559. doi:10.1093/treephys/27.4.551

- Sequerra, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A., Moiroud, A., 1997. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycological Research* 101, 465–472. doi:10.1017/S0953756296002857
- Shridhar, B.S., 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiology Research* 3, 46–52. doi:10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103
- Silva, F.A.M., Assad, E.D., Evangelista, B.A., 2008. Caracterização Climática do Bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P., Ribeiro, J.F. (Eds.), *Cerrado: Ecologia e Flora*. EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, pp. 70–88.
- Silva, M.R.S.S., 2012. Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas. Universidade de Brasília.
- Silva, M.R.S.S., Pereira de Castro, A., Krüger, R.H., Bustamante, M., 2019. Soil bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and management. *Acta Oecologica* 100, 103463. doi:10.1016/j.actao.2019.103463
- Simpson Junior, P.L.S., 2002. Crescimento e fenologia foliar de espécies lenhosas de uma área de cerrado sensu stricto submetida a fertilização. Universidade de Brasília.
- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L., Tiemann, L.K., 2019. To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 85. doi:10.1128/AEM.02546-18
- Souza, R.C., Mendes, I.C., Reis-Junior, F.B., Carvalho, F.M., Nogueira, M.A., Vasconcelos, A.T.R., Vicente, V.A., Hungria, M., 2016. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: how fragile is the Brazilian Cerrado? *BMC Microbiology* 16, 42. doi:10.1186/s12866-016-0657-z
- Spang, A., Caceres, E.F., Ettema, T.J.G., 2017. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 11, 357. doi:10.1126/science.aaf3883
- Sridevi, G., Minocha, R., Turlapati, S.A., Goldfarb, K.C., Brodie, E.L., Tisa, L.S., Minocha, S.C., 2012. Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 728–740. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01258.x
- Ssekagiri, A., Sloan, W.T., Ijaz, U.Z., 2017. microbiomeSeq: an R package for analysis of microbial communities in an environmental context, in: ISCB Africa ASBCB Conference on Bioinformatics. International Society for Computational Biology, Entebbe, Uganda, p. B-064. doi:10.13140/RG.2.2.17108.71047
- Staver, A.C., 2017. Prediction and scale in savanna ecosystems. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.14829
- Stein, L.Y., Klotz, M.G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26, R94–R98. doi:10.1016/j.cub.2015.12.021
- Stock, J. B.; Stock, A. M.; Mottonen, J. M. 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* 333: 395-400.
- Supramaniam, Y., Chong, C.W., Silvaraj, S., Tan, I.K.P., 2016. Effect of short term variation in temperature and water content on the bacterial community in a tropical soil. *Applied Soil Ecology* 107, 279–289. doi:10.1016/j.apsoil.2016.07.003
- Swift, M.J., Andren, O., Brussaard, L., Briones, M., Couteaux, M.-M., Ekschmitt, K., Kjoller, A., Loiseau, P., Smith, P., 1998. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Global Change Biology* 4, 729–743. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00207.x
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews* 599–623. doi:10.1093/femsre/fux039
- Thompson, L.R., Sanders, J.G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K.J., Prill, R.J., Tripathi, A., Gibbons, S.M., Ackermann, G., Navas-Molina, J.A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J.T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., Haroon, M.F., Kanbar, J., Zhu, Q., Jin Song, S., Kosciolk, T., Bokulich, N.A., Lefler, J., Brislawn, C.J., Humphrey, G., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J.A., Clauset, A., Stevens, R.L., Shade, A., Pollard, K.S., Goodwin, K.D., Jansson, J.K., Gilbert, J.A., Knight, R., 2017. A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457–463. doi:10.1038/nature24621
- Tripathi, B.M., Kim, M., Lai-Hoe, A., Shukor, N.A.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2013. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 86, 303–311. doi:10.1111/1574-6941.12163
- Tripathi, B.M., Kim, M., Tateno, R., Kim, W., Wang, J., Lai-Hoe, A., Ab. Shukor, N.A., Rahim, R.A., Go, R., Adams, J.M., 2015. Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biology and*

- Biochemistry 88, 1–8. doi:10.1016/j.soilbio.2015.05.004
- UNESCO, 2003. Subsídios ao zoneamento da APA Gama-Cabeça de Veado e Reserva da Biosfera do Cerrado : caracterização e conflitos socioambientais. Unesco, Brasil, MAB, Reserva da Biosfera, Brasília.
- van der Waal, C., de Kroon, H., de Boer, W.F., Heitkönig, I.M.A., Skidmore, A.K., de Knegt, H.J., van Langevelde, F., van Wieren, S.E., Grant, R.C., Page, B.R., Slotow, R., Kohi, E.M., Mwakiwa, E., Prins, H.H.T., 2009. Water and nutrients alter herbaceous competitive effects on tree seedlings in a semi-arid savanna. *Journal of Ecology* 97, 430–439. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01498.x
- Van Langenhove, L., Depaepe, T., Vicca, S., van den Berge, J., Stahl, C., Courtois, E., Weedon, J., Urbina, I., Grau, O., Asensio, D., Peñuelas, J., Boeckx, P., Richter, A., Van Der Straeten, D., Janssens, I.A., 2019. Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-019-04012-1
- Vanderleyden, J., Van Dommelen, A., Michiels, J., 2001. Fix Genes, in: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 707–709. doi:10.1006/rwgn.2001.1637
- Viana, L.T., Bustamante, M.M.D.C., Molina, M., Pinto, A.D.S., Kisselle, K., Zepp, R., Burke, R. a., 2011. Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. *Pesq. Agropec. Bras.* 46, 1665–1672.
- Vitousek, P., Howarth, R., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13. doi:10.1007/BF00002772
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Spret, J.I., 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57, 1–45.
- Wagner, S.C., 2011. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3, 15.
- Wang, Y., Ji, H., Gao, C., 2016. Differential responses of soil bacterial taxa to long-term P, N, and organic manure application. *Journal of Soils and Sediments* 16, 1046–1058. doi:10.1007/s11368-015-1320-2
- Wieczorek, A.S., Schmidt, O., Chatzinotas, A., von Bergen, M., Gorissen, A., Kolb, S., 2019. Ecological Functions of Agricultural Soil Bacteria and Microeukaryotes in Chitin Degradation: A Case Study. *Frontiers in Microbiology* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01293
- Wilhelm, R.C., Singh, R., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2019. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *The ISME Journal* 13, 413–429. doi:10.1038/s41396-018-0279-6
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wood, S.A., McGuire, K., Hickman, J.E., 2016. Microbial Communities and Processes under Climate and Land-use Change in the Tropics, in: Marxsen, J. (Ed.), *Climate Change and Microbial Ecology: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 214.
- Wu, R., Cheng, X., Zhou, W., Han, H., 2019. Microbial regulation of soil carbon properties under nitrogen addition and plant inputs removal. *PeerJ* 7, e7343. doi:10.7717/peerj.7343
- Wu, Y., Zeng, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Lin, X., 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports* 7, 40093. doi:10.1038/srep40093
- Xue, D., Huang, X., Yao, H., Huang, C., 2010. Effect of lime application on microbial community in acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1253–1260. doi:10.1016/S1001-0742(09)60246-1
- Xun, W., Li, W., Huang, T., Ren, Y., Xiong, W., Miao, Y., Ran, W., Li, D., Shen, Q., Zhang, R., 2018. Long-term agronomic practices alter the composition of asymbiotic diazotrophic bacterial community and their nitrogen fixation genes in an acidic red soil. *Biology and Fertility of Soils* 54, 329–339. doi:10.1007/s00374-018-1264-y
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., Engel, A.S., 2016. The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implication for Soil Acidification. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01955
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., Steward, G.F., 2003. Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial

community structure : a cross-system comparison 5, 539–554.

Zhang, X., Liu, W., Schloter, M., Zhang, G., Chen, Q., Huang, J., Li, L., Elser, J.J., Han, X., 2013. Response of the Abundance of Key Soil Microbial Nitrogen-Cycling Genes to Multi-Factorial Global Changes. PLoS ONE 8, 2–11. doi:10.1371/journal.pone.0076500



Material Suplementar

Respostas da comunidade microbiana do solo em área de Cerrado sentido restrito à diferentes tratamentos de adição de nutrientes

Rafaella Silveira Sousa

MATERIAL SUPLEMENTAR

Capítulo 1 - *Efeitos de longo prazo da adição de nutrientes sobre a diversidade da microbiota associada*

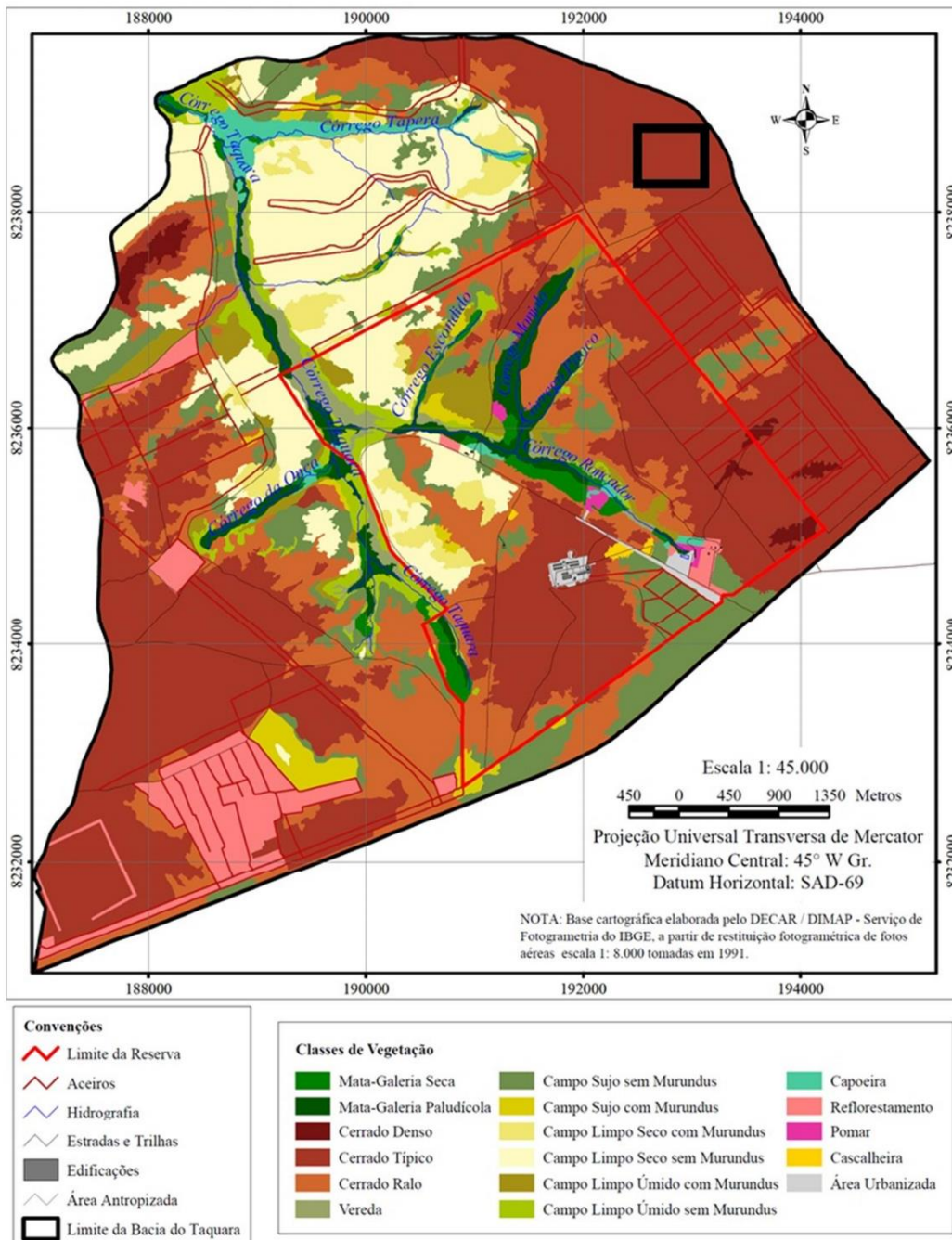


Fig. S1 Mapa de vegetação da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR-IBGE). O quadrado preto representa o local onde se encontra a área do experimento de adição de nutrientes de longa duração. Fonte: Silva, 2012.

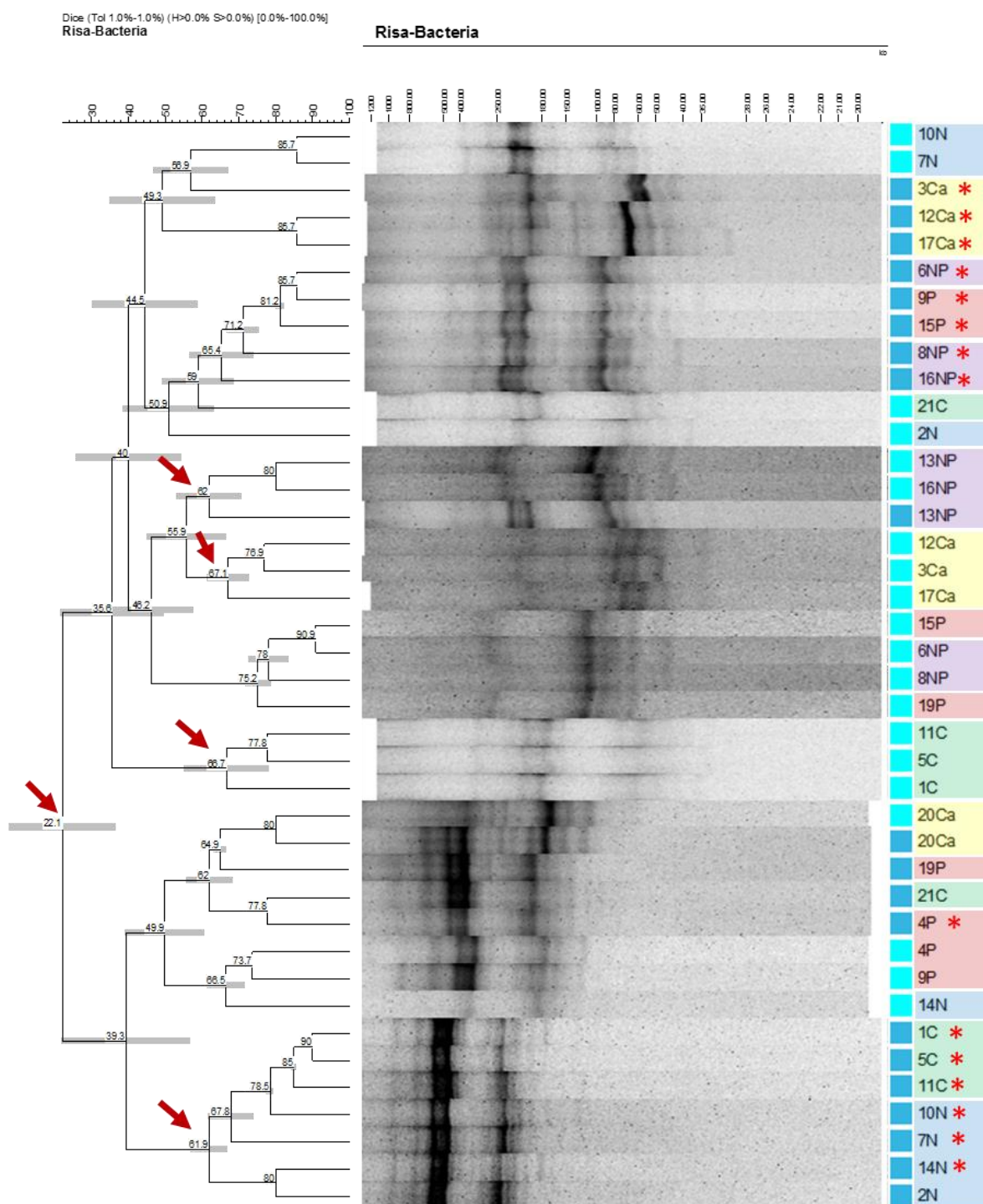


Fig. S2 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades bacterianas do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período. Os asteriscos (*) indicam as amostras selecionadas para sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram incluídas no envio, as amostras da estação seca de 2018 referentes às mesmas parcelas (não demonstradas no gráfico).

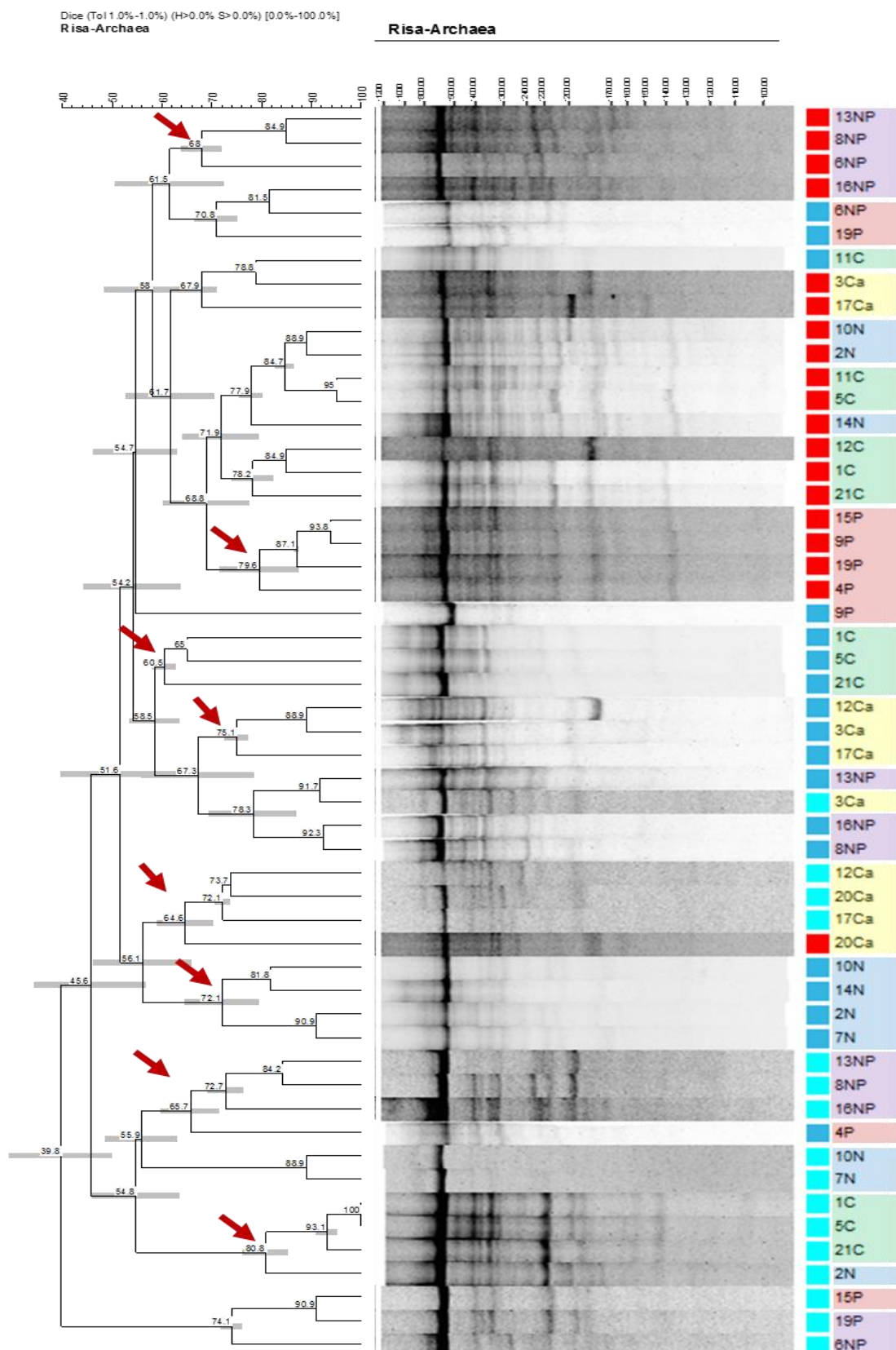


Fig. S3 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades de Archaea do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período.

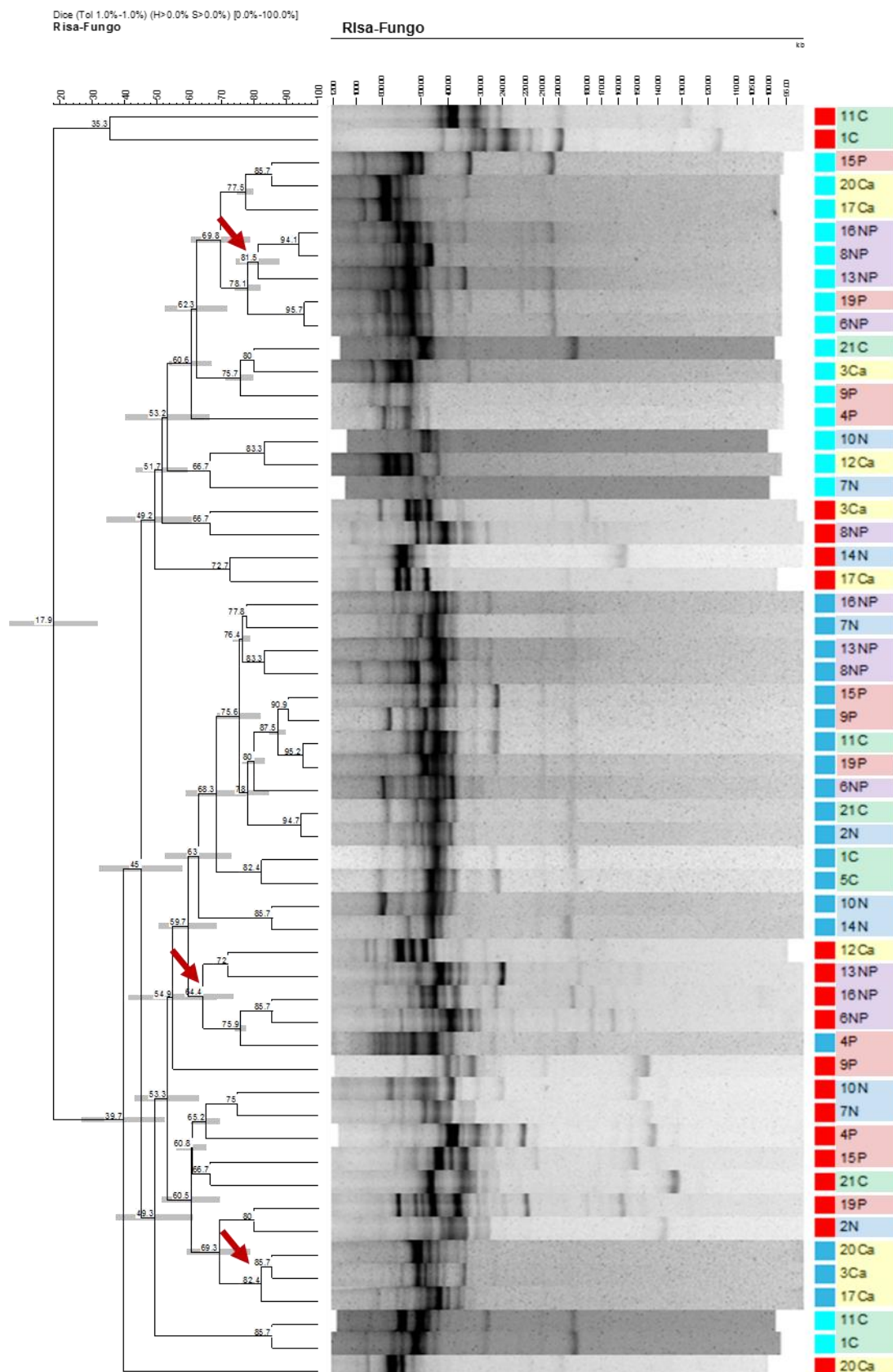


Fig. S4 Dendrograma dos perfis eletroforéticos de PCR-RISA das comunidades de fungos do solo (0-10cm) em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. em parcelas do experimento de adição de nutrientes na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. Amostras da estação chuvosa de 2017 e 2018 são indicadas pela cor azul claro e azul escuro, respectivamente. Os blocos coloridos destacam as parcelas dos tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - lilás), adição de fósforo (P - rosa). As setas indicam alguns dos principais nós que agrupam as amostras por tratamento e/ou período.



Fig. S5 Número de seqüências anotadas dentro dos domínios Archaea (a) e Bacteria (b) após aplicação de todos os filtros de qualidade. As seqüências foram obtidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras de solo (0-10 cm) de um experimento de adição de nutrientes coletadas nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Os tratamentos são: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P).

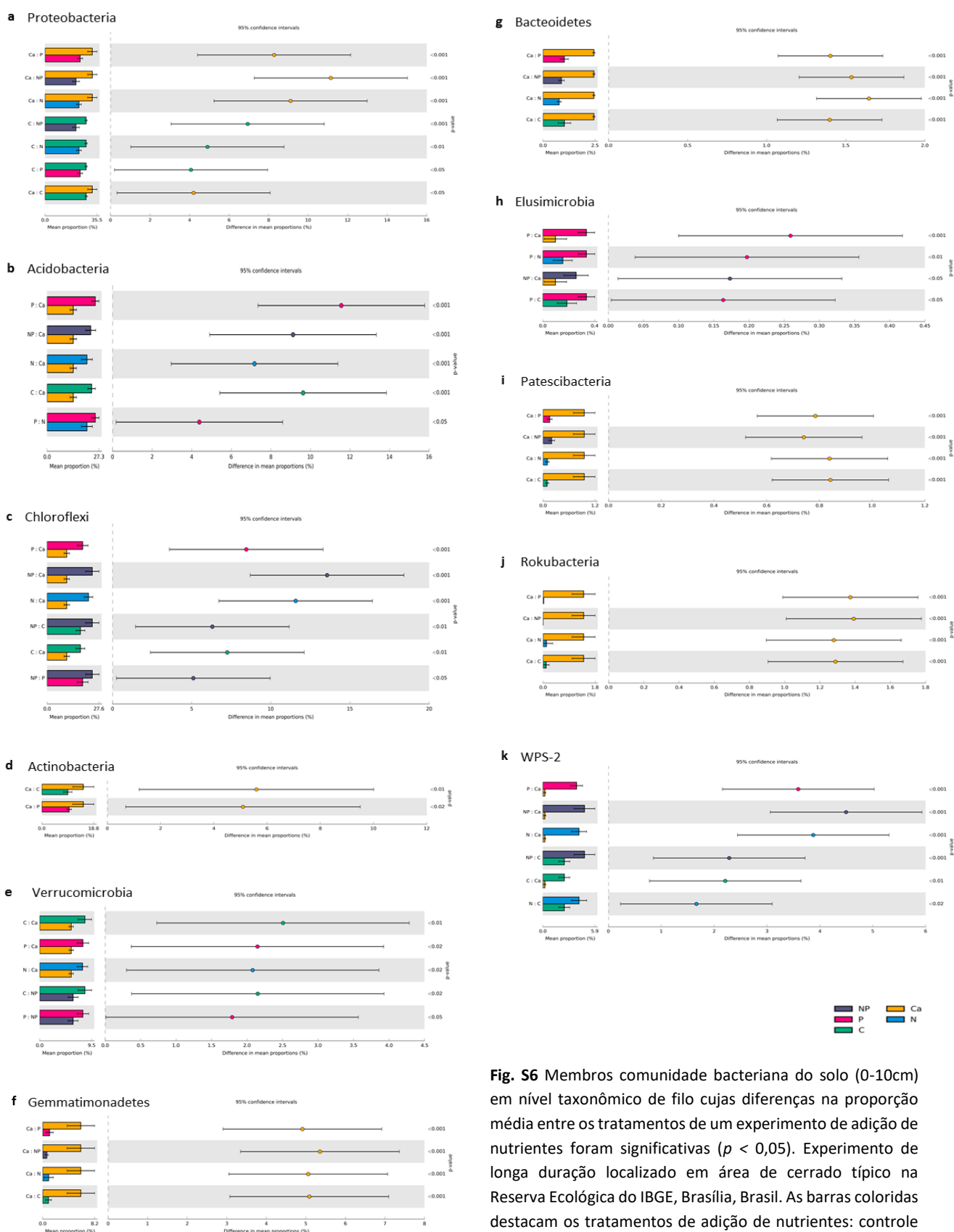


Fig. S6 Membros comunidade bacteriana do solo (0-10cm) em nível taxonômico de filo cujas diferenças na proporção média entre os tratamentos de um experimento de adição de nutrientes foram significativas ($p < 0,05$). Experimento de longa duração localizado em área de cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. As barras coloridas destacam os tratamentos de adição de nutrientes: controle (C - verde), calagem (Ca - amarelo), adição de nitrogênio (N - azul), adição de nitrogênio e fósforo (NP - roxo), adição de fósforo (P - rosa).

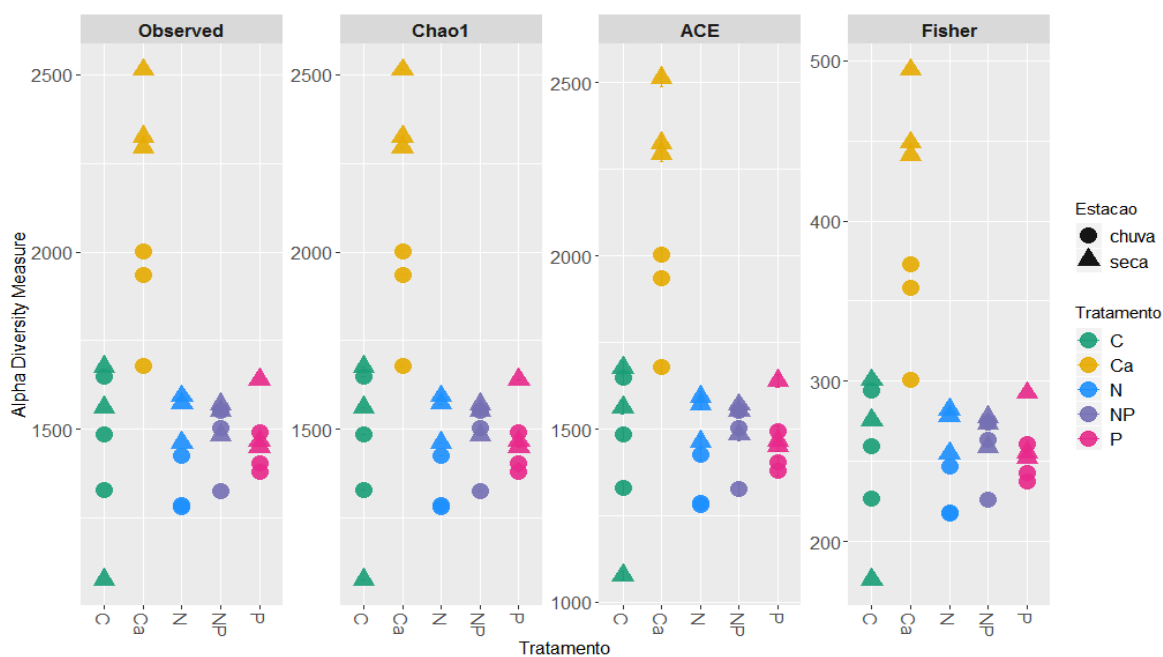


Fig. S7. Estimadores de diversidade da comunidade bacteriana do solo (0 - 10 cm) em uma área experimental de adição de nutrientes de longo prazo, localizada na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil, durante as estações chuvosa e seca de 2018. N – adição de nitrogênio; P – adição de fósforo; NP – adição de nitrogênio e fósforo; Ca – calagem; Control – controle

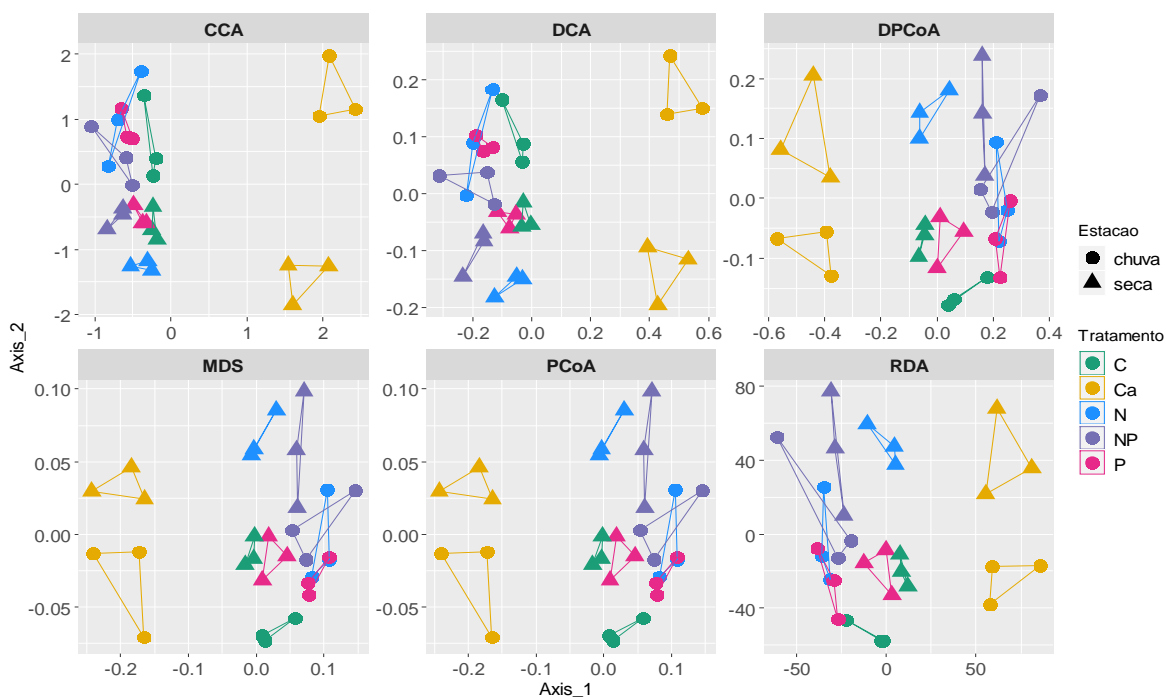


Fig. S8. Diferentes métodos de ordenação da comunidade bacteriana do solo (0 -10 cm) em solos de diferentes tratamentos de adição de nutrientes, nas estações chuvosa e seca de 2018. Experimento de longa duração localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. N – adição de nitrogênio; P – adição de fósforo; NP – adição de nitrogênio e fósforo; Ca – calagem; Control – controle.

Tabela S1 Abundância relativa (%) das famílias dentro dos filos pertencentes a Archaea nos solos (0-10cm) dos tratamentos de adição de nutrientes. Experimento de longa duração e, área de cerrado típico localizado na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, Brasil. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), adição de nitrogênio (N), adição de e nitrogênio e fósforo (NP) e adição de fósforo (P). Também são mostradas as abundâncias médias para as estações chuvosa e seca de 2018 e o percentual médio geral de cada grupo na população considerando todos os tratamentos e estações. Somente grupos com abundância $\geq 1\%$ na média geral são mostrados. Ordens dentro de cada classe com abundância menor que 1% estão agrupadas em “Outros”.

| Grupos | chuva | | | | | chuva Total | seca | | | | | seca Total | Total Geral |
|--|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------------|
| | C | Ca | N | NP | P | | C | Ca | N | NP | P | | |
| Crenarchaeota | 12.88 | 0.33 | 13.90 | 3.28 | 6.11 | 5.50 | 5.60 | 0.37 | 1.39 | 1.78 | 5.09 | 1.88 | 3.64 |
| Bathyarchaeia | 12.88 | 0.33 | 13.90 | 3.28 | 6.11 | 5.50 | 5.60 | 0.37 | 1.39 | 1.78 | 5.09 | 1.88 | 3.64 |
| archaeon RBG_16_50_20 | 12.88 | 0.33 | 13.90 | 2.83 | 5.88 | 5.34 | 5.60 | 0.37 | 1.39 | 1.78 | 4.96 | 1.86 | 3.55 |
| archaeon RBG_16_50_20 | 12.88 | 0.33 | 13.90 | 2.83 | 5.88 | 5.34 | 5.60 | 0.37 | 1.39 | 1.78 | 4.96 | 1.86 | 3.55 |
| unidentified archaeon | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.45 | 0.23 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.13 | 0.02 | 0.09 |
| unidentified archaeon | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.45 | 0.23 | 0.16 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.13 | 0.02 | 0.09 |
| Diapherotrites | 0.00 | 0.14 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.90 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.08 | 0.07 |
| Iainarchaeia | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| Iainarchaeales | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| Micrarchaeia | 0.00 | 0.08 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.90 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.08 | 0.06 |
| Candidatus Micrarchaeota archaeon CG1_02_55_22 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.90 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.03 |
| Candidatus Micrarchaeota archaeon CG1_02_55_22 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.90 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.03 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| mine drainage metagenome | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.01 |
| mine drainage metagenome | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.01 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| uncultured euryarchaeote | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| uncultured euryarchaeote | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| Euryarchaeota | 5.50 | 19.62 | 3.99 | 4.19 | 6.07 | 9.21 | 3.90 | 33.17 | 3.85 | 3.77 | 5.13 | 15.05 | 12.21 |
| Methanobacteria | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.04 | 0.25 | 0.08 | 0.05 |
| Methanobacteriales | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.04 | 0.25 | 0.08 | 0.05 |
| Methanobacteriaceae | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.04 | 0.25 | 0.08 | 0.05 |
| Methanomicrobia | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.02 | 0.01 |
| Methanosarcinales | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.02 | 0.01 |
| Methanosarcinaceae | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.02 | 0.01 |
| Thermoplasmata | 5.50 | 19.62 | 3.99 | 4.15 | 6.07 | 9.19 | 3.90 | 33.17 | 3.63 | 3.64 | 4.88 | 14.94 | 12.15 |
| Marine Group II | 2.58 | 19.54 | 0.95 | 0.82 | 1.48 | 6.72 | 1.10 | 33.11 | 0.07 | 0.42 | 1.25 | 12.82 | 9.86 |
| uncultured archaeon | 2.58 | 19.54 | 0.83 | 0.82 | 1.48 | 6.70 | 1.10 | 32.80 | 0.07 | 0.42 | 1.25 | 12.71 | 9.79 |
| uncultured haloarchaeon | 0.00 | 0.00 | 0.12 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.31 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.12 | 0.07 |
| Methanomassiliicoccales | 1.76 | 0.00 | 0.34 | 0.16 | 0.53 | 0.29 | 0.50 | 0.00 | 0.37 | 0.00 | 0.21 | 0.12 | 0.20 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Methanomethylphilaceae | 1.76 | 0.00 | 0.34 | 0.16 | 0.53 | 0.29 | 0.50 | 0.00 | 0.37 | 0.00 | 0.21 | 0.12 | 0.20 |
| uncultured | 1.17 | 0.08 | 2.70 | 3.17 | 4.06 | 2.18 | 2.30 | 0.06 | 3.19 | 3.22 | 3.42 | 2.00 | 2.09 |
| uncultured crenarchaeote | 1.17 | 0.08 | 2.70 | 3.17 | 4.06 | 2.18 | 2.30 | 0.06 | 3.19 | 3.22 | 3.42 | 2.00 | 2.09 |
| Nanoarchaeaeota | 0.00 | 2.21 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.67 | 0.00 | 1.04 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.39 | 0.53 |
| Nanohaloarchaeia | 0.00 | 0.57 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.10 |
| Aenigmarchaeales | 0.00 | 0.57 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.10 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.57 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.10 |
| Woesearchaeia | 0.00 | 1.64 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.00 | 0.96 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.36 | 0.43 |
| Candidatus Diapherotrites archaeon ADurb.Bin253 | 0.00 | 0.18 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 |
| Candidatus Diapherotrites archaeon ADurb.Bin253 | 0.00 | 0.18 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 |
| Candidatus Staskawiczbacteria bacterium RIFOXYA2_FULLL_32_7 | 0.00 | 0.31 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 |
| Candidatus Staskawiczbacteria bacterium RIFOXYA2_FULLL_32_7 | 0.00 | 0.31 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 |
| metagenome | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| metagenome | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.55 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.70 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.26 | 0.22 |
| uncultured archaeon | 0.00 | 0.55 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.70 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.26 | 0.22 |
| uncultured euryarchaeote | 0.00 | 0.53 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.16 | 0.00 | 0.26 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.13 |
| uncultured euryarchaeote | 0.00 | 0.53 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.16 | 0.00 | 0.26 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 0.13 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Thaumarchaeota | 81.62 | 77.70 | 82.04 | 92.53 | 87.82 | 84.57 | 89.60 | 65.35 | 94.76 | 94.45 | 89.79 | 82.61 | 83.56 |
| Group 1.1c | 66.39 | 1.04 | 52.64 | 34.49 | 54.74 | 33.02 | 69.20 | 1.46 | 37.59 | 26.42 | 47.64 | 24.29 | 28.52 |
| uncultured archaeon | 9.60 | 0.12 | 17.22 | 12.22 | 14.98 | 9.88 | 10.60 | 0.31 | 8.47 | 5.86 | 6.54 | 4.56 | 7.14 |
| uncultured archaeon | 9.60 | 0.12 | 17.22 | 12.22 | 14.98 | 9.88 | 10.60 | 0.31 | 8.47 | 5.86 | 6.54 | 4.56 | 7.14 |
| uncultured crenarchaeote | 40.16 | 0.70 | 24.83 | 13.40 | 26.37 | 15.40 | 44.80 | 0.87 | 22.04 | 11.72 | 30.01 | 13.78 | 14.57 |
| uncultured crenarchaeote | 40.16 | 0.70 | 24.83 | 13.40 | 26.37 | 15.40 | 44.80 | 0.87 | 22.04 | 11.72 | 30.01 | 13.78 | 14.57 |
| uncultured thaumarchaeote | 16.63 | 0.23 | 10.59 | 8.87 | 13.39 | 7.75 | 13.80 | 0.28 | 7.08 | 8.84 | 11.09 | 5.94 | 6.82 |
| uncultured thaumarchaeote | 16.63 | 0.23 | 10.59 | 8.87 | 13.39 | 7.75 | 13.80 | 0.28 | 7.08 | 8.84 | 11.09 | 5.94 | 6.82 |
| Nitrososphaeria | 15.22 | 76.65 | 29.40 | 58.04 | 33.08 | 51.54 | 20.40 | 63.89 | 57.17 | 68.03 | 42.14 | 58.32 | 55.03 |
| Nitrososphaerales | 3.75 | 76.55 | 10.99 | 23.48 | 5.27 | 33.02 | 10.20 | 63.56 | 42.17 | 23.58 | 18.13 | 40.05 | 36.64 |
| Nitrososphaeraceae | 3.75 | 76.55 | 10.99 | 23.48 | 5.27 | 33.02 | 10.20 | 63.56 | 42.17 | 23.58 | 18.13 | 40.05 | 36.64 |
| Nitrosotaleales | 11.48 | 0.10 | 18.42 | 34.56 | 27.81 | 18.52 | 10.20 | 0.33 | 15.00 | 44.45 | 24.01 | 18.27 | 18.40 |
| Nitrosotaleaceae | 11.48 | 0.10 | 18.42 | 34.56 | 27.81 | 18.52 | 10.20 | 0.33 | 15.00 | 44.45 | 24.01 | 18.27 | 18.40 |
| Total Geral | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.00 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.00 | 100.00 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100.00 | 100.00 |

Chapter 2 - Long-term liming promotes drastic changes in the composition of the microbial community in a tropical savanna soil
Biology and Fertility of Soils

Table S1 Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy season of 2017, 11 years after the last limestone addition. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between control and Ca based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns.

| | Treatment (Rainy Season) | | | | | | F value | p value |
|---|--------------------------|-------|------|-------|-------|------|---------|--------------|
| | Control | | | Ca | | | | |
| OM (dag/kg) | 7.08 | \pm | 0.51 | 5.82 | \pm | 0.56 | 8.30 | 0.045 |
| P (available, mg/dm ³) | 0.53 | \pm | 0.06 | 1.30 | \pm | 0.40 | 10.80 | 0.030 |
| K (mg/dm ³) | 30.00 | \pm | 6.56 | 11.33 | \pm | 3.21 | 23.17 | 0.009 |
| Ca ²⁺ (cmolc/dm ³) | 0.12 | \pm | 0.03 | 5.67 | \pm | 0.53 | 879.00 | 0.000 |
| Mg ²⁺ (cmolc/dm ³) | 0.08 | \pm | 0.01 | 3.33 | \pm | 0.37 | 1449.00 | 0.000 |
| Al ³⁺ (cmolc/dm ³) | 1.20 | \pm | 0.17 | 0.00 | \pm | 0.00 | 1013.00 | 0.000 |
| pH | 4.55 | \pm | 0.06 | 5.92 | \pm | 0.19 | 151.30 | 0.000 |
| Moisture (%) | 27.65 | \pm | 2.62 | 23.41 | \pm | 3.22 | 3.12 | 0.152 |
| Temperature (°C) | 19.03 | \pm | 0.38 | 18.66 | \pm | 0.65 | 0.71 | 0.446 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 1.54 | \pm | 0.84 | 0.61 | \pm | 0.05 | 3.65 | 0.13 |
| Exchangeable N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 25.06 | \pm | 2.90 | 20.97 | \pm | 3.88 | 2.14 | 0.22 |
| Inorganic N (mg/kg) | 26.60 | \pm | 3.67 | 21.60 | \pm | 3.85 | 2.68 | 0.18 |

Table S2 Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy or dry season of 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between control and Ca based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns. Red asterisks point to differences between rows

| Treatment (Rainy Season) | | | | | | | | |
|--|--------------|-------|--------------|-------------|-------|-------------|---------|--------------|
| | Control | | | Ca | | | F value | p value |
| TC (%) | 3.87 | \pm | 0.51 | 3.48 | \pm | 0.18 | 1.63 | 0.271 |
| TN (%) | 0.20 | \pm | 0.02 | 0.17 | \pm | 0.01 | 6.29 | 0.066 |
| CN ratio | 19.12 | \pm | 0.86 | 20.44 | \pm | 0.35 | 6.13 | 0.069 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 2.19 | \pm | 0.23 | 2.22 | \pm | 0.76 | 0.08 | 0.782 |
| N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 31.74 | \pm | 1.45 | 29.41 | \pm | 5.90 | 1.38 | 0.274 |
| Inorganic N (mg/kg) | 21.40 | \pm | 11.40 | 19.50 | \pm | 11.50 | 1.09 | 0.327 |
| P (available, mg/kg) | 1.77 | \pm | 0.40 | 0.73 | \pm | 0.35 | 11.17 | 0.029 |
| K (mg/dm ³) | 31.67 | \pm | 2.52 | 10.67 | \pm | 2.31 | 113.40 | 0.000 |
| Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.21 | \pm | 0.01 | 4.62 | \pm | 0.18 | 1836.00 | 0.000 |
| Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.12 | \pm | 0.01 | 2.77 | \pm | 0.15 | 954.70 | 0.000 |
| Al ³⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.97 | \pm | 0.20 | 0.00 | \pm | 0.00 | 73.71 | 0.001 |
| Season (Rainy vs. Dry) | | | | | | | | |
| | Rainy | | | Dry | | | F value | p value |
| Moisture (%) | 38.07 | \pm | 3.94 | 22.98 | \pm | 3.59 | 50.52 | 0.000 |
| Temperature (°C) | 21.66 | \pm | 0.71 | 18.62 | \pm | 0.68 | 51.97 | 0.000 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 2.20 | \pm | 0.51 | 1.71 | \pm | 0.25 | 3.71 | 0.090 |
| Exchangeable N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 28.40 | \pm | 3.76 | 8.58 | \pm | 1.30 | 140.14 | 0.000 |
| Inorganic N (mg/kg) | 30.60 | \pm | 4.05 | 10.30 | \pm | 1.27 | 125.57 | 0.000 |
| Treatment * Season | | | | | | | | |
| | Rainy | | | Dry | | | F value | p value |
| pH – Control | 4.73 | \pm | 0.20* | 4.02 | \pm | 0.10* | - | 0.001 |
| pH – Ca | 6.24 | \pm | 0.11 | 6.07 | \pm | 0.06 | - | 0.415 |
| pH – Control vs. Ca | $p = 0.001$ | | | $p = 0.000$ | | | 13.60 | 0.006 |

Table S3 Physical and chemical properties of soil (0-10 cm depth) in the control and liming (Ca) treatments collected in the rainy season of 2017 and 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. Results are expressed as mean values \pm standard error. Mean differences between 2017(after 11 years without liming) and 2018 (four months after liming resumption) based on ANOVA ($p < 0.05$). Bold values highlight differences between columns.

| Control (between years) | | | | | | | |
|--|-------|------------|--------------|-------------------|---------|--------------|--|
| | 2017 | | 2018 | | F value | p value | |
| P (available, mg/dm ³) | 0.53 | \pm 0.06 | 1.77 | \pm 0.40 | 27.38 | 0.006 | |
| K (mg/dm ³) | 30.00 | \pm 6.56 | 31.67 | \pm 2.52 | 0.169 | 0.700 | |
| Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.12 | \pm 0.03 | 0.21 | \pm 0.01 | 30.73 | 0.005 | |
| Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.08 | \pm 0.01 | 0.12 | \pm 0.01 | 42.25 | 0.003 | |
| Al ³⁺ (cmol _c /dm ³) | 1.20 | \pm 0.17 | 0.97 | \pm 0.20 | 2.401 | 0.196 | |
| pH | 4.55 | \pm 0.06 | 4.73 | \pm 0.20 | 2.462 | 0.192 | |
| Moisture (%) | 27.65 | \pm 2.62 | 37.83 | \pm 5.63 | 8.074 | 0.047 | |
| Temperature (°C) | 19.03 | \pm 0.38 | 22.07 | \pm 0.74 | 40.02 | 0.003 | |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 1.54 | \pm 0.84 | 2.19 | \pm 0.23 | 11.28 | 0.01 | |
| N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 25.06 | \pm 2.90 | 29.60 | \pm 1.61 | 6.31 | 0.04 | |
| Inorganic N | 26.60 | \pm 3.67 | 31.74 | \pm 1.45 | 7.74 | 0.02 | |
| Ca treatment (between years) | | | | | | | |
| | 2017 | | 2018 | | F value | p value | |
| P (available, mg/dm ³) | 1.30 | \pm 0.40 | 0.73 | \pm 0.35 | 3.4 | 0.139 | |
| K (mg/dm ³) | 11.33 | \pm 3.21 | 10.67 | \pm 2.31 | 0.085 | 0.785 | |
| Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 5.67 | \pm 0.53 | 4.62 | \pm 0.18 | 10.89 | 0.030 | |
| Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³) | 3.33 | \pm 0.37 | 2.77 | \pm 0.15 | 5.928 | 0.072 | |
| Al ³⁺ (cmol _c /dm ³) | 0.00 | \pm 0.00 | 0.00 | \pm 0.00 | NA | NA | |
| pH | 5.92 | \pm 0.18 | 6.24 | \pm 0.11 | 6.369 | 0.065 | |
| Moisture (%) | 23.41 | \pm 3.22 | 38.30 | \pm 2.65 | 38.32 | 0.003 | |
| Temperature (°C) | 18.66 | \pm 0.65 | 21.25 | \pm 0.44 | 32.64 | 0.005 | |
| N-NO ₃ ⁻ (mg/kg) | 0.61 | \pm 0.05 | 2.22 | \pm 0.76 | 11.28 | 0.01 | |
| Exchangeable N-NH ₄ ⁺ (mg/kg) | 20.97 | \pm 3.88 | 27.20 | \pm 5.35 | 6.31 | 0.04 | |
| Inorganic N (mg/kg) | 21.58 | \pm 3.85 | 29.41 | \pm 5.90 | 7.74 | 0.02 | |

Table S4 Correlation scores (with the four axes) from the Analysis of the principal components (PCA) ordination of standardized physical and chemical parameters from composed soil samples (0-10 cm) of the control (C) and liming (Ca) collected during the rainy season in 2017 and 2018. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil.

| | | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 |
|------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| 2017 | OM | -0.91798 | 0.3343 | 0.2134 | -0.00357 |
| | pH | 0.98025 | 0.059868 | 0.093046 | 0.14886 |
| | P | 0.94427 | -0.19615 | 0.23883 | -0.11263 |
| | K | -0.89923 | -0.39698 | 0.11286 | 0.14447 |
| | Ca ²⁺ | 0.96242 | 0.21746 | 0.02036 | 0.14667 |
| 2018 | P | 0.90232 | 0.43096 | 0.00606 | 0.007492 |
| | pH | -0.97407 | 0.21734 | 0.058485 | -0.02315 |
| | K | 0.96722 | -0.24362 | 0.071275 | 0.007236 |
| | Ca ²⁺ | -0.99683 | 0.066004 | 0.020102 | 0.03971 |

Table S5 Relative abundances (%) of Bacterial and Archaeal communities from the soil (0-10 cm) in the control and liming (Ca) treatments. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil. *p*- values, mean and also total percentage are showed.

| | | Control | | Ca | | <i>p</i> -values | Mean difference | Total (%) |
|-----------------------|------------------|---------|-------|------|-------|------------------|-----------------|-----------|
| Bateria domain | | | | | | | | |
| Dominant | Proteobacteria | 28.2 | ± 0.8 | 32.4 | ± 3.2 | 3.0E-02 | -4.185 | 30.3 |
| | Acidobacteria | 23.5 | ± 2.0 | 13.8 | ± 1.7 | 2.5E-03 | 9.701 | 18.6 |
| | Chloroflexi | 17.8 | ± 2.4 | 10.5 | ± 1.5 | 3.7E-03 | 7.298 | 14.1 |
| | Actinobacteria | 9.4 | ± 1.5 | 15.0 | ± 3.8 | 2.4E-02 | -5.596 | 12.2 |
| Intermediary | Planctomycetes | 6.7 | ± 1.2 | 9.9 | ± 2.4 | 3.3E-02 | -3.128 | 8.3 |
| | Verrucomicrobia | 8.3 | ± 1.3 | 5.8 | ± 0.4 | 4.1E-03 | 2.530 | 7.0 |
| | Gemmatimonadetes | 0.9 | ± 0.5 | 6.0 | ± 2.2 | 4.0E-03 | -5.101 | 3.5 |
| | Bacteroidetes | 1.0 | ± 0.3 | 2.4 | ± 0.1 | 2.0E-03 | -1.399 | 1.7 |
| | WPS-2 | 2.4 | ± 0.6 | 0.2 | ± 0.1 | 3.3E-03 | 2.221 | 1.3 |
| Rare | Rokubacteria | 0.1 | ± 0.1 | 1.4 | ± 0.4 | 3.4E-03 | -1.292 | 0.8 |
| | Armatimonadetes | 0.9 | ± 0.2 | 0.6 | ± 0.2 | 0.1 | 0.277 | 0.7 |
| | Patescibacteria | 0.1 | ± 0.0 | 0.9 | ± 0.2 | 3.0E-03 | -0.844 | 0.5 |
| | GAL15 | 0.6 | ± 0.4 | 0.4 | ± 0.1 | 0.2 | 0.243 | 0.5 |
| | Latescibacteria | 0.0 | ± 0.0 | 0.7 | ± 0.3 | 3.9E-03 | -0.725 | 0.4 |
| Archaea domain | | | | | | | | |
| Dominant | Thaumarchaeota | 85.1 | ± 7.7 | 70.8 | ± 9.0 | 1.4E+01 | 0.022 | 77.9 |
| | Euryarchaeota | 4.6 | ± 2.8 | 26.7 | ± 9.3 | -2.2E+01 | 0.001 | 15.7 |
| Intermediary | Crenarchaeota | 10.1 | ± 8.4 | 0.5 | ± 0.4 | 9.7E+00 | 0.019 | 5.3 |
| Rare | Nanoarchaeaeota | 0.0 | ± 0.0 | 1.9 | ± 1.1 | -1.9E+00 | 0.006 | 1.0 |
| | Diapherotrites | 0.2 | ± 0.5 | 0.1 | ± 0.1 | 0.6 | 0.120 | 0.1 |

Dominant: >10%; intermediary: 1-10%; rare: <1%

Table S6 General KEGG functional categories associated with microbial composition control and liming soils from a long-term experimental area cerrado. Soils were collected from a typical cerrado area where the long-term fertilization experiment was installed, in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil.

| KEEG | Enzyme definition | Pathway | General metabolism |
|--------|---|---|---------------------|
| K00043 | 4-hydroxybutyrate dehydrogenase [EC:1.1.1.61] | butanoate metabolism | carbon metabolism |
| K00317 | dimethylamine/trimethylamine dehydrogenase [EC:1.5.8.1 1.5.8.2] | methane metabolism | carbon metabolism |
| K00855 | phosphoribulokinase [EC:2.7.1.19] | carbon fixation in photosynthetic organism | carbon metabolism |
| K01070 | S-formylglutathione hydrolase [EC:3.1.2.12] | methane metabolism | carbon metabolism |
| K01601 | ribulose-bisphosphate carboxylase large chain [EC:4.1.1.39] | carbon fixation in photosynthetic organisms | carbon metabolism |
| K01602 | ribulose-bisphosphate carboxylase small chain [EC:4.1.1.39] | carbon fixation in photosynthetic organisms | carbon metabolism |
| K01622 | fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase [EC:4.1.2.13 3.1.3.11] | fructose and mannose metabolism, methane metabolism | carbon metabolism |
| K01849 | methylmalonyl-CoA mutase, C-terminal domain [EC:5.4.99.2] | valine, leucine and isoleucine degradation | carbon metabolism |
| K04100 | protocatechuate 4,5-dioxygenase, alpha chain [EC:1.13.11.8] | polycyclic aromatic hydrocarbon degradation | carbon metabolism |
| K04101 | 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase [EC:4.1.1.55] | polycyclic aromatic hydrocarbon degradation | carbon metabolism |
| K05299 | formate dehydrogenase alpha subunit [EC:1.2.1.43] | methane metabolism | carbon metabolism |
| K06859 | glucose-6-phosphate isomerase, archaeal [EC:5.3.1.9] | amino sugar and nucleotide sugar metabolism | carbon metabolism |
| K09709 | 3-methylfumaryl-CoA hydratase [EC:4.2.1.153] | carbon fixation pathways in prokaryotes | carbon metabolism |
| K14467 | 4-hydroxybutyrate---CoA ligase (AMP-forming) [EC:6.2.1.40] | carbon fixation pathways in prokaryotes | carbon metabolism |
| K00531 | nitrogenase delta subunit [EC:1.18.6.1] | nitrogen metabolism | nitrogen metabolism |
| K02305 | nitric oxide reductase subunit C | nitrogen metabolism | nitrogen metabolism |
| K02586 | nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain [EC:1.18.6.1] | nitrogen metabolism | nitrogen metabolism |
| K02588 | nitrogenase iron protein NifH [EC:1.18.6.1] | nitrogen metabolism | nitrogen metabolism |
| K02591 | nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1] | nitrogen metabolism | nitrogen metabolism |
| K00651 | homoserine O-succinyltransferase [EC:2.3.1.46] | cysteine and methionine metabolism | sulfur metabolism |
| K05301 | sulfite dehydrogenase [EC:1.8.2.1] | sulfur metabolism | sulfur metabolism |
| K08738 | cytochrome c | two-component system/energy metabolism | sulfur metabolism |

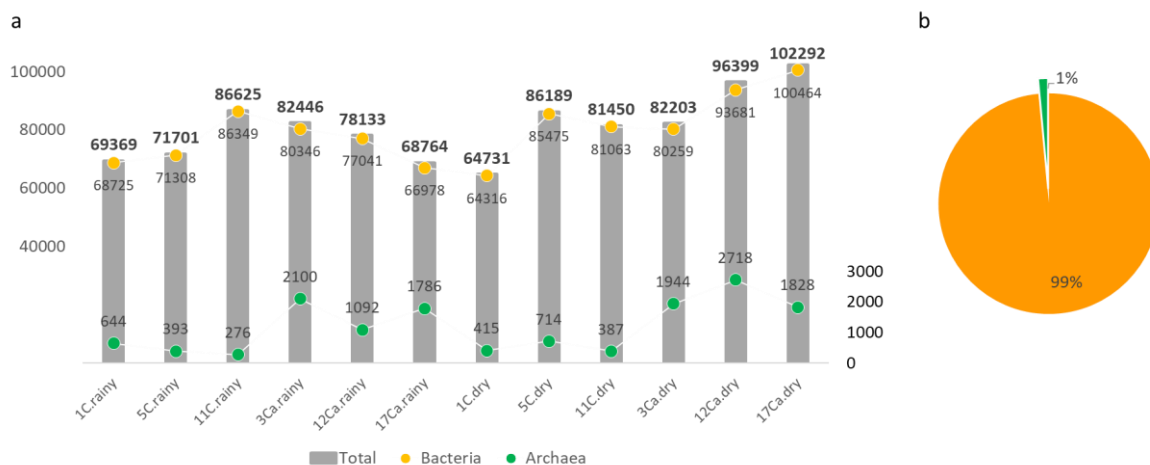


Fig. S1 Final number of 16S rRNA analyzed reads in soil samples (0-10 cm) from control and liming (Ca) treatments in a typical cerrado area in the IBGE Ecological Reserve, Brasília, Brazil, during the rainy and dry seasons of 2018. a) Total number of reads per sample represented by bar and number of reads assigned to Bacteria and Archaea domains represented by points. b) Proportion of reads assigned to Bacteria and Archaea in the entire dataset.

***Chapter 3 - Seasonal and long-term effects of nutrient additions
and liming on the potential activity of nitrogen fixation in
Cerrado soils***

Table S1 The ten significant alignments (> 200 bp) on BLAST *nifH* cloned fragment based on the Nucleotide collection (nt) database.

| Description | Query Cover (%) | Per. Ident (%) | Accession |
|--|-----------------|----------------|------------|
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC756 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 91 | 96.43 | KY548259.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC765 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 97 | 94.39 | KY548268.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC978 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 93 | 95.56 | KY548244.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC781 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 90 | 96.39 | KY548261.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC757 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 90 | 96.37 | KY548260.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC771 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 97 | 94.16 | KY548272.1 |
| Bradyrhizobium sp. strain BRUESC1001 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 90 | 96.13 | KY548246.1 |
| Uncultured Bradyrhizobium sp. clone SF-2-8 nitrogenase (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 98 | 93.58 | KM052355.1 |
| Uncultured bacterium clone ISA7508 NifH (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 96 | 93.91 | KP069513.1 |
| Uncultured bacterium clone ISA5107 NifH (<i>nifH</i>) gene, partial cds | 96 | 93.91 | KP069507.1 |

