

EFEITO DAS CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS NA BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO EM SOUTOS DEMONSTRAÇÃO

Letícia Santos Lopes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Faculdade
Evangélica de Goianésia.*

Orientada por

Professora Doutora Ermelinda Lopes Pereira
Professora Doutora Maria do Sameiro Ferreira Patrício

Bragança

2024

Dissertação elaborada no âmbito do Projeto PDR2020-032060 GO_ClimCast “Os novos desafios para o souto no contexto das alterações climáticas”, financiado pelo FEADER e pelo Estado Português, no âmbito da Ação 1.1 “Grupos Operacionais” integrado na Medida 1. «Inovação» do PDR2020- Programa de Desenvolvimento Rural do Continente



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola
de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha inabalável gratidão a Deus por conceder-me força e oportunidade de transformar adversidades em realização de um sonho.

Uma homenagem especial é direcionada às minhas estimadas orientadoras, Professora Doutora Ermelinda Lopes Pereira e Professora Doutora Maria do Sameiro Ferreira Patrício, além dos profundamente respeitados Professores Doutores Jadson Moura e Rodrigo Fernandes, cujas contribuições foram indispensáveis para meu desenvolvimento intelectual e culminação deste trabalho.

A Sandra Afonso, não apenas colega, mas pilar de apoio e conhecimento no laboratório, minha gratidão por sua compreensão e ensinamentos. Agradeço imensamente ao Professor Doutor Altino Choupina pela generosidade em compartilhar seu tempo, conhecimento e recursos laboratoriais.

A Professora Doutora Margarida Arrobas e toda a equipe do Laboratório de Solos, especialmente Rita Diz, recebam meu sincero agradecimento pelo acolhimento inicial e atenção dedicada.

À minha família, meus pais, mãe, irmãos e avó, cujo suporte foi meu alicerce, minhas primas, Natália Ribeiro e Isabelly Lima e aos meus queridos amigos – Ana Paula Marques, Alane Giaretta, Gabriella Mota, Gabriel Brandão, Lana Gabrielle, Pedro Henrique Guedes, Theomara Marques e meu amigos e colegas do grupo PRAD, agradeço por cada esforço e apoio direcionados à minha jornada e à concretização desta dissertação.

Minhas queridas colegas de curso, Joceline Santos e, *in memoriam*, Sílvia Mesquita, sua ajuda, sorrisos e apoio permanecerão comigo. Agradeço profundamente por cada momento compartilhado. Expresso minha calorosa gratidão àqueles que se tornaram parte da minha vida em Portugal. A amizade de todos foi um bálsamo para a saudade do Brasil e uma força motriz na busca incessante pelos meus sonhos.

Aos amigos e familiares no Brasil, obrigada por manterem-se presentes, mesmo à distância, oferecendo consideração e desejos de sucesso, fundamentais para minha jornada.

A todos e todas que foram parte desta conquista e da minha vida, dedico esta vitória. Este triunfo é nosso.

Serei para sempre grata!

“A natureza é a melhor professora, e a diversidade da vida no solo é uma das suas maiores lições.”

(Darwin, Charles).

RESUMO

Os microrganismos presentes no solo desempenham um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas terrestres, regulando e fornecendo nutrientes às plantas. O seu desequilíbrio pode afectar significativamente a comunidade vegetal, impactando a abundância, saúde e qualidade do solo. O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) é vital para a economia de algumas regiões da Europa, especialmente o norte de Portugal, devido à produção de fruto e madeira. As alterações edafoclimáticas podem interferir directamente na produtividade do castanheiro, na biodiversidade associada e nos seus ecossistemas. O presente trabalho pretendeu estudar o efeito das condições edafoclimáticas na biodiversidade microbiana do solo em dois soutos de demonstração localizados no distrito de Bragança (Parada e Salgueiros). As amostras de solo foram colhidas em cada souto demonstração em três períodos do ano (primavera, verão e outono) a uma profundidade de 0-20 cm, tendo sido analisados parâmetros físico-químicos (pH, teor de humidade, carbono orgânico, fósforo, potássio e bases de troca) e microbiológicos, designadamente a respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana, azoto da biomassa microbiana, assim como a quantificação de bactérias e fungos. A composição da comunidade bacteriana e fúngica das amostras de solo foi avaliada por sequenciamento de nucleótidos das regiões 16S RNA e ITS(ITS1-ITS2), respetivamente, com a plataforma Illumina MiSeq. Os resultados revelaram diferenças entre locais, sobretudo nos valores de pH e nos teores de C orgânico. O souto de Parada apresentou valores de $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ (5,84) e teores de Carbono orgânico ($18,99 \text{ g kg}^{-1}$) mais elevados relativamente ao souto de Salgueiros, 5,11 e $11,84 \text{ g kg}^{-1}$, respetivamente. Os valores de carbono microbiano, azoto microbiano e a respiração basal do solo variaram sazonalmente, sendo essas variações mais expressivas no souto de menor altitude (Parada). A diferenciação entre locais manifestou-se também na abundância e composição da comunidade bacteriana e fúngica. O souto demonstração de Salgueiros (maior altitude) apresentou maior estabilidade das populações bacterianas e fúngicas ao longo das estações. As famílias bacterianas Acidobacteraceae e Xanthobacteraceae foram as mais frequentes e com maior predominância em ambos os locais e nas três épocas avaliadas, bem como a família fúngica Trimorphomycetaceae. A maior diferenciação entre locais verificou-se com as famílias Pleosporaceae e Phaeosphaeriaceae que ocorreram apenas em Parada.

Palavras-chave: *Castanea sativa* Mill., carbono microbiano, respiração do solo, azoto microbiano, bactérias, fungos.

ABSTRACT

Soil microorganisms play a fundamental role in maintaining terrestrial ecosystems by regulating and providing nutrients to plants. Their imbalance can significantly affect plant communities, impacting the abundance, health, and quality of the soil. The European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is crucial for the economy of certain regions of Europe, especially in northern Portugal, due to its fruit and timber production. Edaphoclimatic changes can directly interfere with the productivity of chestnut trees, the associated biodiversity, and their ecosystems. This study aimed to investigate the effect of edaphoclimatic conditions on soil microbial biodiversity in two demonstration chestnut orchards located in the district of Bragança (Parada and Salgueiros). Soil samples were collected from each demonstration site during three seasons (spring, summer, and autumn) at a depth of 0-20 cm, and analyzed for physicochemical parameters (pH, moisture content, organic carbon, phosphorus, potassium, and exchangeable bases) and microbiological parameters, including soil basal respiration, microbial biomass carbon, and microbial biomass nitrogen, as well as the quantification of bacteria and fungi. The composition of the bacterial and fungal communities in the soil samples was assessed by nucleotide sequencing of the 16S rRNA and ITS (ITS1-ITS2) regions, respectively, using the Illumina MiSeq platform. The results revealed differences between the sites, particularly in pH values and organic carbon content. The Parada orchard exhibited higher pH_(H₂O) values (5.84) and organic carbon content (18.99g kg⁻¹) compared to the Salgueiros orchard, which had values of 5.11 and 11.84 g kg⁻¹, respectively. The values of microbial carbon, microbial nitrogen, and soil basal respiration varied seasonally, with more pronounced variations observed at the lower altitude site (Parada). The differentiation between sites was also evident in the abundance and composition of bacterial and fungal communities. The Salgueiros demonstration site (higher altitude) showed greater stability of bacterial and fungal populations throughout the seasons. The bacterial families Acidobacteraceae and Xanthobacteraceae were the most frequent and dominant across both locations and throughout the three seasons studied, as well as the fungal family Trimorphomycetaceae. The greatest differentiation between the sites was observed with the fungal families Pleosporaceae and Phaeosphaeriaceae, which were found only in Parada.

Keywords: *Castanea sativa* Mill., microbial carbon, soil respiration, microbial nitrogen, bacteria, fungi

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	2
2.1 O castanheiro e sua importância regional	2
2.2 O impacto das alterações climáticas na comunidade microbiana do solo.....	3
2.3 Bioindicadores na avaliação da qualidade do solo	4
3 MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1 Área de estudo.....	6
3.2 Amostragem do solo.....	7
3.3 Análises dos parâmetros físico-químicos	7
3.4. Análise dos parâmetros microbiológicos.....	8
3.4.1 Determinação do carbono e azoto da biomassa microbiana	8
3.4.2 Determinação da respiração basal do solo (RBS).....	9
3.4.3 Quantificação de bactérias e fungos	11
3.4.4 Identificação molecular de bactérias e fungos	12
3.5. Tratamento estatístico	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Propriedades químicas do solo das áreas estudadas	14
4.2 Atividade biológica do solo.....	15
4.3 Caracterização da comunidade microbiana	17
4.3.1 Quantificação de bactérias e fungos	17
4.3.2 Composição da comunidade bacteriana.....	18
4.3.3 Composição da comunidade fúngica	20
5. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Souto de demonstração Salgueiros, Vinhais.	6
Figura 2 - Souto de demonstração Parada, Bragança.	6
Figura 3 - Preparação e crivagem das amostras.	7
Figura 4 – Processo de filtração das amostras com filtros Watman nº 42	9
Figura 5 - Processo de titulação do carbono microbiano.	9
Figura 6 - Frascos de vidro para incubação das amostras de solo.....	10
Figura 7 - Titulação das amostras com solução de HCl 0,5N.	10
Figura 8 - Preparação das amostras de solo para diluição seriada e espalhamento em placa. ...	11
Figura 9 - Colónias de fungos no meio RBC (esquerda) e colónias de bactérias em meio PCA (direita).	11
Figura 10 - Processo de extração do DNA genómico utilizando o kit FastDNATM SPIN.	12
Figura 11 - Confirmação da presença de DNA nas amostras através de eletroforese.....	12
Figura 12 -Composição da comunidade bacteriana nos dois locais estudados nas diferentes estações do ano (SR- Salgueiros no período do outono, SN- Salgueiros no período do verão, SA- Salgueiros no período da primavera, PR- Parada no período do outono, PN- Parada no período de verão, PA- Parada no período da primavera).	19
Figura 13 - Composição da comunidade fúngica nos dois locais estudados nas diferentes estações do ano (SR- Salgueiros no período do outono, SN- Salgueiros no período do verão, SA- Salgueiros no período da primavera, PR- Parada no período do outono, PN- Parada no período de verão, PA- Parada no período da primavera).	21

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo (0-20 cm) de Parada e de Salgueiro.	14
Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana (C_{mic}), azoto da biomassa microbiana (N_{mic}), quociente microbiano (C_{mic}/C_{org}), Respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico (qCO_2) em amostras do solo de Parada e Salgueiros	16
Tabela 3. População de bactérias e fungos dos solos (log UFC/g de solo seco).	18

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos sectores mais sensíveis às alterações climáticas. Os padrões de precipitação e temperatura, bem como a sua distribuição ao longo do ano, e a incidência de eventos climáticos extremos, são variáveis críticas para a sustentabilidade do sector segundo Freitas et al. (2021). O papel desempenhado pelos microrganismos do solo na manutenção dos ecossistemas tem sido cada vez mais associado à qualidade ambiental, dada a sensibilidade destes às variações ambientais e climáticas (Silveira & Freitas, 2007).

As condições climáticas constituem um aspecto importante que afecta o desenvolvimento dos povoamentos do castanheiro. O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) é uma espécie de grande valor económico para algumas regiões da Europa, como é o caso do norte de Portugal, devido à exploração do seu fruto e madeira. O castanheiro prefere solos profundos, ricos em matéria orgânica, bem estruturados, permeáveis e arejados, de textura suave, que permitam um desenvolvimento radicular profundo (Aguin-Pombo et al., 2018).

Conforme descrito por Freitas et al. (2021), reconhece-se que as mudanças climáticas têm um papel significativo na eficácia produtiva dos castanheiros, na diversidade biológica relacionada e em seus ecossistemas. A produção de castanhas é substancialmente afetada tanto pelas condições climáticas médias quanto pelas extremas que ocorrem ao longo do seu ciclo anual. Portanto, torna-se primordial discernir os efeitos das mudanças climáticas nesses árvores, aprimorando o entendimento atual das conexões entre clima, solo e árvore. Isso é vital para, no futuro, enfrentar essas mudanças e desenvolver estratégias adaptativas apropriadas.

Neste sentido, neste projeto, instalou-se em 2018 uma rede de soutos demonstração (SD) em ambientes contrastantes com o objectivo de estudar e adaptar os soutos existentes às novas condições edafoclimáticas. Neste trabalho consideram-se 2 SD, localizados em Parada – Bragança e Salgueiros – Vinhais, pertencentes a essa rede, com o objectivo de estudar o efeito das condições edafoclimáticas no microbioma do solo. Neste contexto, este trabalho centra-se na análise de amostras de solo, nas três subdivisões climáticas do ano (primavera, verão e outono), com o intuito de estudar o efeito das condições edafoclimáticas na biodiversidade microbiana do solo destes SD localizados no distrito de Bragança.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1 O castanheiro e sua importância regional

O castanheiro é uma espécie com dupla aptidão (fruto e madeira) que pertence à família das Fagáceas e ao género *Castanea*. O género *Castanea* apresenta ao todo doze espécies, destacando-se as espécies *Castanea sativa* Miller, *C. crenata* Siebold & Zucc., *C. mollissima* Blume e *C. dentata* Mash. Borkh. Estas espécies são conhecidas, respectivamente, como castanheiro europeu, castanheiro japonês, castanheiro chinês e castanheiro americano (Maynard et al., 2008). O castanheiro europeu é uma árvore de folha caduca, monoica, que pode atingir 30 m de altura e mais de um milénio de idade. As suas folhas, crenado-serradas ou serradas, têm entre 10-25 cm x 5-8 cm, oblongo-lanceoladas, subtruncadas na base e verde acizentadas, quando jovens, na página inferior (Patrício, 1996). Os seus frutos (castanhas) são muito apreciados.

A cultura do castanheiro exige condições climáticas e pedológicas próprias para o seu desenvolvimento e satisfatória produção. Do ponto de vista climático, o castanheiro é uma espécie mesotérmica, preferindo regiões com temperaturas médias anuais entre 8 e 15 °C, e requerendo 6 meses de temperaturas médias superiores a 10 °C para boas produções de fruto. Esta espécie tolera invernos rigorosos, mas não se adapta a temperaturas médias mensais inferiores a 1 °C, nem a temperaturas médias mínimas inferiores a -15 °C (Patrício, 1996; Aguin-Pombo et al., 2018).

O castanheiro é uma das mais importantes espécies folhosas mediterrânicas, podendo ser encontrada tanto em florestas acompanhadas por outras espécies vegetais e animais, como em pomares tradicionais (soutos) muitas vezes com árvores centenárias (Patrício et al., 2020). É uma espécie característica das zonas submontanas e montanas, encontrando-se as melhores áreas para produção de castanha entre os 650-900 m de altitude. Contudo, em floresta para produção de madeira e outros serviços do ecossistema pode atingir 1100 m de altitude em Portugal e 1600 m na Serra Nevada (Patrício, 1996). Segundo o autor, prefere vertentes frescas de influência Norte e solos derivados de xisto ou granito.

Segundo Freitas et al. (2021), os castanheiros prosperam em planícies ou colinas muito suaves e encostas de montanhas, dado que solos com boa drenagem suportam melhor as estruturas radiculares. Esta espécie perene cresce em solos cambissolos dístricos crómicos, derivados de materiais parentais migmatíticos e gnáissicos. Revela má adaptação a solos calcários ou argilosos, mas aprecia solos sedimentares, siliciosos e

ácidos a neutros. O solo deve ser profundo (superior a 60 cm), rico em matéria orgânica (3,3%) e com pH entre 5,5 e 6,3.

No que concerne à precipitação, o castanheiro é considerado uma espécie mesófila, prosperando em regiões com precipitações anuais entre 600 e 1600 mm (com uma queda mínima de 200 mm – 25% do total anual – no período de abril a julho). Chuvas persistentes, ventos fortes, temperaturas baixas durante o período de floração (maio a junho) e excesso de humidade atmosférica (agosto e setembro) prejudicam o desenvolvimento do fruto (Gonçalves, 2021).

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística - INE na Europa, o castanheiro é uma das espécies mais importantes. Em Portugal, a região norte concentra cerca de 88% da área de produção e 82% da produção declarada de castanha, enquanto a região centro produz cerca de 12% da produção declarada. O norte de Portugal lidera a produção de castanha, com uma produção de 42,2 mil toneladas de castanha numa área de 51,7 mil hectares em 2020 (FAOSTAT, 2022).

2.2 O impacto das alterações climáticas na comunidade microbiana do solo

As mudanças climáticas estão a alterar a distribuição de espécies, a biodiversidade, a função dos ecossistemas e a impactar simultaneamente as interações entre organismos (Berghäll et al., 2007). De acordo com a Comissão Europeia, prevê-se temperaturas mais altas e estações de crescimento mais longas, acompanhadas por condições climáticas extremas mais frequentes e intensas, como eventos de chuvas severas, secas ou ondas de calor. Estas alterações climáticas poderão provocar alterações nas interações entre os microrganismos. É improvável que todos os organismos respondam de forma semelhante às alterações climáticas dado que as comunidades naturais são compostas por organismos com características muito diferentes em termos de história de vida e capacidade de dispersão (Classen et al., 2015). As interações microbianas do solo entre si, e também com as plantas, podem moldar padrões paisagísticos de abundância, diversidade e composição de plantas e animais. A variação de temperatura pode influenciar diferentes aspectos biológicos e evolutivos, nos hospedeiros e parasitoides, podendo resultar em efeitos no desenvolvimento e morte de indivíduos patogénicos ou na redução da produtividade (Classen et al., 2015).

As bactérias e os fungos do solo desempenham papéis cruciais no ciclo de nutrientes do solo. A influência sobre as comunidades bacterianas e fúngicas, devido a

fatores do solo e clima, varia consoante a composição e estrutura da comunidade microbiana (Ma et al., 2019). Num ecossistema natural, as mudanças nos fatores climáticos geralmente determinam mudanças nas propriedades do solo e na vegetação que, por sua vez, afectam indiretamente os microrganismos do solo. Por exemplo, a precipitação afecta as bactérias do solo, assim como o pH, salinidade e outras propriedades do solo (Sun et al., 2020). Segundo Alkorta et al. (2017), temperaturas mais altas significam geralmente níveis mais altos de atividade microbiana no solo. Por exemplo, o aquecimento estimula diferencialmente a função dos genes envolvidos na degradação do carbono do solo, indicando que esta estimulação parece ser apenas temporária e que a actividade microbiana se aclimata a temperaturas mais altas a longo prazo. Outros estudos demonstram que as taxas inicialmente aceleradas de decomposição do carbono do solo podem declinar com o aquecimento prolongado, devido a uma redução no carbono do solo, biomassa microbiana e actividade ao longo do tempo.

De acordo com Boddy et al. (2013), os efeitos das mudanças climáticas na distribuição e actividade dos fungos são difíceis de prever devido à diversidade de fatores mediadores, incluindo fisiologia fúngica, reprodução, sobrevivência, fisiologia do hospedeiro, distribuição espacial e temporal de hospedeiros, disponibilidade de recursos, e o resultado de interações inter e intra-específicas. Os fungos desempenham um papel importante na sustentabilidade dos sistemas agroecológicos, melhorando a estrutura do solo. Inúmeros fatores influenciam a composição e função das comunidades fúngicas (Hernandez 2019).

2.3 Bioindicadores na avaliação da qualidade do solo

A importância do solo no funcionamento dos ecossistemas é destacada na avaliação da sua qualidade, não apenas para a produção de alimentos, mas também como um recurso vital global (Mendes et al., 2009). Atributos biológicos como a biomassa microbiana, a atividade heterotrófica e a atividade enzimática relacionada com ciclos biogeoquímicos de nutrientes são usados eficientemente como bioindicadores da qualidade do solo em contextos variados, incluindo solos degradados e impactados por metais pesados (Alkorta et al., 2017).

A microbiota do solo, responsável pela decomposição de resíduos orgânicos e pelo fluxo de nutrientes, justifica a inclusão de indicadores microbiológicos nos índices de

qualidade do solo. Contudo, a simples quantificação da biomassa não reflete completamente a atividade das populações microbianas, tornando-se necessário analisar parâmetros como a atividade enzimática e a respiração para monitorizar o estado metabólico das comunidades microbianas (Ferreira et al., 2017).

A biomassa microbiana corresponde à fração viva da matéria orgânica do solo podendo conter entre 1% a 4% de C e 3% a 5% de N. Esta fração, constituída por bactérias, fungos e outros microrganismos, tem um papel importante nos processos de decomposição da matéria orgânica, promoção da sustentabilidade biológica e da produtividade nos ecossistemas. (Reis Junior & Mendes, 2007). A libertação ou imobilização desses nutrientes depende da dinâmica dos microrganismos, da quantidade de resíduos vegetais, do rápido retorno e da eficiência de utilização de carbono pela microbiota (Perez et al., 2005). Assim, as propriedades microbianas, como a atividade da biomassa microbiana e os parâmetros enzimáticos do solo, são indicadores fiáveis do impacto das práticas de gestão no solo, influenciando a disponibilidade de nutrientes e a produtividade dos agroecossistemas (Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2011). O carbono da biomassa microbiana (C_{mic}) é um componente ativo da matéria orgânica, crucial para a qualidade ambiental e a sustentabilidade dos agroecossistemas (Perez et al., 2005; Simões et al., 2010).

A respiração basal do solo (RBS) é um parâmetro-chave para quantificar a atividade microbiana, refletindo mudanças na dinâmica do carbono do solo, e está intimamente relacionada com condições abióticas como humidade e temperatura (Envagelista et al., 2007; Valentini et al., 2015). Este parâmetro tem sido utilizado para avaliar a atividade biológica em sistemas agrícolas diversos. O quociente metabólico do solo (qCO_2), que representa a quantidade de CO_2 libertado por unidade de biomassa microbiana em determinado tempo, é usado para avaliar a eficiência do uso de substrato pelos microrganismos.

A disponibilidade de azoto no solo, essencial para a formação de biomoléculas vitais, está diretamente relacionada com a produtividade agrícola e é influenciada pela vegetação e condições ambientais, que alteram a heterogeneidade e a taxa de decomposição da matéria orgânica. A análise do azoto da biomassa microbiana (N_{mic}) é crucial para aferir a conservação da matéria orgânica e avaliar alterações ambientais (Perez et al., 2005; Silva e Azevedo, 2007; Cardoso & Andreote, 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O presente trabalho realizou-se em dois soutos de demonstração (SD) instalados em 2018, no âmbito do projeto GO_ClimCast, em condições climáticas contrastantes, na localidade de Salgueiros, pertencente ao concelho de Vinhais (Figura 1) (41°54'12.73" N; 7°01'40.95" W, altitude: 1008 m, Exposição S), e em Parada, concelho de Bragança (Figura 2) (41°38'12.53" N; 6°42'42.94" W, altitude: 740 m, exposição S-SE). A área de cada um dos soutos é de aproximadamente 0,5 hectares.



Figura 1 - Souto de demonstração Salgueiros, Vinhais.

Figura 2 - Souto de demonstração Parada, Bragança.

A precipitação média anual em Salgueiros é da ordem de 1215,6 mm e em Parada de 821,1 mm (INMG, 1991). A temperatura média anual para a região é de 12,6 °C, a temperatura máxima absoluta é de 39,5 °C, atingida no mês de agosto, e a mínima absoluta é de -11,6 °C, observada no mês de fevereiro (Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P. (IPMA, I. P., 2021).

O relevo é ondulado e os solos são derivados de xistos, com uma composição elevada de elementos grosseiros, correspondendo a região de Parada e Salgueiros a Leptossolos dístricos órticos (solos incipientes que se caracterizam por serem jovens pouco evoluídos, delgados, com profundidades até 30 cm, limitados por uma rocha contínua) (FAO 2015). As áreas de estudo anteriormente à instalação dos SD apresentavam usos de ocupação do solo diferentes (cereal em Salgueiros e floresta de pinheiro em Parada).

3.2 Amostragem do solo

Para avaliação da atividade microbiana do solo em cada SD em estudo foram realizadas amostragens em três épocas do ano, primavera (maio), verão (junho) e outono (outubro) de 2021, na profundidade de 0-20 cm (foi eliminada a camada superficial do solo mais ressequida ≈ 5 cm). Em cada SD colheram-se 5 amostras de forma aleatória em zig-zag na proximidade da caldeira, a cerca de 50 cm do pé da árvore. Após a colheita das amostras estas foram acondicionadas e transportadas para o laboratório em mala térmica, onde foram crivadas com um crivo de malha de 2 mm (Figura 3) e removidos os resíduos vegetais e fragmentos de raízes visíveis.



Figura 3 - Preparação e crivagem das amostras.

3.3 Análises dos parâmetros físico-químicos

Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

- i) Análise de parâmetros físico-químicos (pH, teor de humidade; matéria orgânica, fósforo, potássio e bases de troca);
- ii) Análise de parâmetros microbiológicos: quantificação e identificação de bactérias e fungos, determinação da respiração basal do solo (RBS) e determinação do carbono e azoto da biomassa microbiana (C_{mic} ; N_{mic});

O pH das amostras do solo foi determinado potenciométricamente numa suspensão de solo e água e numa solução de KCl, na proporção de 1:2,5 (m/v).

O fósforo (P) e o potássio (K) extraíveis foram determinados de acordo com o método de Egner-Riehm, numa solução de lactato de amónia e ácido acético a pH 3,7 na proporção de 1:20 (p/v) (Balbino, 1968). O fósforo no extrato foi determinado por espectrofotometria UV/VIS e o potássio por fotometria de chama.

O carbono orgânico do solo (C_{org}) foi determinado pelo método de Walkey-Black. Este método baseia-se na oxidação do carbono orgânico no solo na presença de dicromato e ácido sulfúrico concentrado.

As bases de troca, cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+) e sódio (Na^+) foram extraídas numa solução de acetato de amónia tamponizada a pH 7,0. Os catiões Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados por espectrometria de absorção atómica. Os catiões K^+ e Na^+ foram obtidos por espectrometria de emissão de chama (Reeuwijk, 2002).

A acidez de troca, alumínio (Al^{3+}) e hidrogénio (H^+), foram determinados por titulação após extração com cloreto de potássio (KCl 1M).

Para determinação do teor de humidade das amostras foi pesado uma porção de solo e, em seguida, colocado numa estufa a uma temperatura de 105°C até atingir o peso constante.

3.4. Análise dos parâmetros microbiológicos

3.4.1 Determinação do carbono e azoto da biomassa microbiana

A determinação do carbono da biomassa microbiana (C_{mic}) e do azoto da biomassa microbiana (N_{mic}) do solo foi realizada pelo método de fumigação-extração de acordo com as metodologias descritas por Silva e Azevedo (2007), através de fumigação direta das amostras (20 g de solo) com 1mL de clorofórmio livre de etanol. Após este processo as amostras foram incubadas em estufa a 25°C durante 24 h no escuro. No final do período de incubação, os frascos foram abertos numa hotte, de modo a serem eliminados os vestígios de clorofórmio, e em seguida foi adicionado uma solução de sulfato de potássio (K_2SO_4) a 0,5 M, na proporção (1:4 m/v), nas amostras fumigadas e não fumigadas. Após a agitação das amostras, durante 30 minutos a 200 rpm, estas foram filtradas com filtros de Watman nº 42 e armazenadas no frio (Figura 4).



Figura 4 – Processo de filtração das amostras com filtros Watman n° 42 .

A determinação do carbono da biomassa microbiana nos extratos foi feita por oxidação com dicromato de potássio 0,066 M, seguida de titulação com sulfato de ferro amoniacal 0,033M (Figura 5). A determinação do azoto da biomassa microbiana nos extratos foi realizada pelo método de Kjeldahl.

O CBM e o NBM foi calculado pela diferença entre os valores de carbono e de azoto obtido nas amostras fumigadas e o das amostras não fumigadas, multiplicado respetivamente pelo fator de correção do carbono (kC) de 0,33 (Sparling & West, 1988) e o fator de correção do azoto (kN) de 0,54.

O quociente microbiano foi obtido pela razão entre C_{mic} e o carbono orgânico total do solo. O N_{mic} foi calculado através do fluxo obtido da diferença da quantidade de N recuperado no extrato da amostra fumigada e não fumigada, multiplicado pelo fator de correção (kN).



Figura 5- Processo de titulação do carbono microbiano.

3.4.2 Determinação da respiração basal do solo (RBS)

A respiração basal do solo (RBS) foi determinada de acordo com a norma ISO 16072 (2002). Para tal, consideraram-se 25g de solo de cada amostra que foram incubadas à temperatura de 25°C, durante 10 dias, em frascos de vidro hermeticamente fechados

contendo 20 mL de uma solução de NaOH 2M, para a captura do CO₂ libertado pela amostra (Figura 6).



Figura 6- Frascos de vidro para incubação das amostras de solo.

Após a incubação adicionou-se BaCl₂ 10% (m/v), para precipitação do carbonato, e o excesso de NaOH foi determinado por titulação com solução de HCl 0,5 N (Figura 7). Como indicador utilizaram-se 2 gotas de fenolftaleína 1% (m/v).

O quociente metabólico (qCO₂) do solo foi calculado dividindo a RBS pelo C_{mic}. O cálculo da RBS foi feito tendo em conta a seguinte formula:

$$qCO_2(\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{BMS} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{RBS}(\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{BMS} \cdot \text{h}^{-1})}{\text{CBM}(\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{BMS} \cdot \text{h}^{-1}) \times 10^{-3}}$$

Onde:

- qCO₂ representa o quociente metabólico do solo.
- RBS é a respiração basal do solo.
- CBM refere-se ao Carbono da Biomassa Microbiana (C_{mic}) do solo.
- mg C-CO₂·g⁻¹ BMS·h⁻¹ é a unidade de medida, indicando miligramas de dióxido carbono por grama de biomassa microbiana do solo por hora.



Figura 7- Titulação das amostras com solução de HCl 0,5N.

3.4.3 Quantificação de bactérias e fungos

A contagem de microrganismos viáveis do solo (bactérias e fungos) foi feita pelo método de diluição seriada e espalhamento em placa. Pesaram-se 10 g de solo de cada amostra adicionando-se depois 90 mL de água peptonada esterilizada. Após agitação da amostra, durante 20 minutos a 200 rotações por minuto (rpm), e sedimentação, realizaram-se diluições decimais. Em seguida procedeu-se à sementeira de 0,1 mL de cada diluição efetuada, em duplicad, nos meios de cultura. Para a contagem de bactérias utilizou-se o meio de cultura Plate Count Agar (PCA, Liofilchem, Italy), com adição de 100 mg/L de cicloheximida. A adição de cicloheximida no meio PCA permitiu inibir o crescimento de fungos (Figura 8).



Figura 8 - Preparação das amostras de solo para diluição seriada e espalhamento em placa.

Para a quantificação de fungos utilizou-se o meio de cultura *Rose Bengal Chloramphenicol* (RBC, Liofilchem, Italy). A presença de cloranfenicol no meio de cultura RBC permitiu inibir o crescimento de bactérias.

As placas com meio PCA foram incubadas a 30°C durante 72 h e as de RBC foram incubadas a 25°C durante 120 h. No final do período de incubação procedeu-se à contagem das colónias (Figura 9) e os resultados foram expressas em logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama de solo seco (log UFC/g).



Figura 9- Colónias de fungos no meio RBC (esquerda) e colónias de bactérias em meio PCA (direita).

3.4.4 Identificação molecular de bactérias e fungos

Para extração do DNA genômico, utilizou-se o Kit FastDNA™ SPIN para solo. Foram preparadas 3 amostras compósitas de solo de cada SD. As amostras foram colocadas em tubos de 2mL contendo a matriz de lise E, uma mistura de partículas de cerâmica e sílica projetada para analisar com eficiência todos os organismos do solo. A homogeneização ocorreu na presença do Tampão MT e Tampão Fosfato de Sódio que são reagentes para proteger e solubilizar ácidos nucleicos e proteínas (Figura 10).



Figura 10- Processo de extração do DNA genômico utilizando o kit FastDNATM SPIN.

Esses reagentes funcionam sinergicamente para permitir a extração de DNA genômico com contaminação mínima de RNA. Após a lise, as amostras foram centrifugadas para sedimentar o solo, restos celulares e matriz de lise. O DNA foi purificado a partir do sobrenadante com um procedimento GeneClean® baseado em sílica usando filtros SPIN. Depois de eluído, o DNA ficou pronto e a presença do DNA nas amostras foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 11). Posteriormente as amostras de DNA foram congeladas e enviadas para o Laboratório da Universidade de Salamanca, Espanha, para amplificação e sequenciamento de nucleótidos das regiões 16S rRNA e ITS(ITS1-ITS2), com a plataforma Illumina MiSeq.

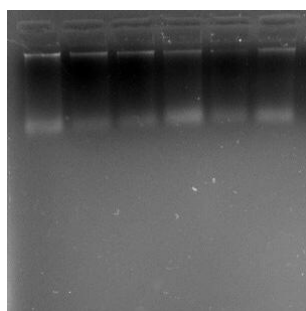


Figura 11- Confirmação da presença de DNA nas amostras através de eletroforese.

3.5. Tratamento estatístico

Para o tratamento e organização dos dados, recorreu-se ao software Microsoft Excel. As análises de maior complexidade foram realizadas utilizando o software R versão 3.5.1. Na comparação múltipla das médias, aplicou-se o teste de Tukey, considerando um nível de significância de p inferior a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propriedades químicas do solo das áreas estudadas

A Tabela 1 apresenta os resultados das propriedades químicas dos solos nas duas áreas de estudo: Parada e Salgueiros. Os resultados indicam diferenças significativas entre os locais, principalmente nos parâmetros de pH, teor de carbono orgânico e bases de troca.

Os valores de pH mostraram uma diferença marcante entre Parada e Salgueiros, tanto em H₂O como em KCl, com o solo de Salgueiros apresentando um pH mais baixo (pH H₂O 5,11) em comparação com o solo de Parada (pH H₂O 5,84). Estes solos são classificados como ácidos, característica comum em solos derivados de xistos, que contêm uma quantidade significativa de elementos grosseiros e apresentam elevada acidez potencial. A diferença superior a uma unidade entre o pH medido em H₂O e KCl reforça esta acidez potencial, de acordo com estudos de Mello et al. (1983) e Rodrigues & Arrobas (2020).

Tabela 1. Atributos químicos do solo (0-20 cm) de Parada e de Salgueiro.

Parâmetros	Parada	Salgueiro
pH (H ₂ O)	5,84 ± 0,07 ^a	5,11 ± 0,07 ^b
pH (KCl)	4,80 ± 0,02 ^a	4,03 ± 0,02 ^b
Carbono orgânico (g kg ⁻¹)	18,99 ± 0,23 ^a	11,84 ± 0,41 ^b
Azoto total (g kg ⁻¹)	0,62 ± 0,02 ^b	1,34 ± 0,16 ^a
P extraível (mg kg ⁻¹)	19,29 ± 3,61 ^a	17,54 ± 1,36 ^a
K extraível (mg kg ⁻¹)	170,46 ± 5,53 ^a	82,46 ± 1,27 ^b
Ca ⁺⁺ (cmol (+) kg ⁻¹)	4,82 ± 0,18 ^a	1,78 ± 0,03 ^b
Mg ⁺⁺ (cmol (+) kg ⁻¹)	0,85 ± 0,03 ^a	0,76 ± 0,07 ^a
K ⁺ (cmol (+) kg ⁻¹)	0,52 ± 0,03 ^a	0,21 ± 0,00 ^b
Na ⁺ (cmol (+) kg ⁻¹)	0,07 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,00 ^a
Acidez de troca (cmol (+) kg ⁻¹)	0,27 ± 0,06 ^b	3,13 ± 0,51 ^a
CTCe (cmol (+) kg ⁻¹)	6,53 ± 0,15 ^a	5,97 ± 0,42 ^a

Nota: P – fósforo; K – potássio; CTCe – capacidade de troca catiónica efetiva; Letras diferentes por linha indicam diferenças significativas (p<0.05).

Os teores de carbono orgânico (CO) variaram significativamente entre os locais, com valores mais elevados em Parada (18,99 g kg⁻¹) do que em Salgueiros (11,84 g kg⁻¹). Estes valores indicam um teor baixo de matéria orgânica, conforme a classificação do

Manual de Fertilização das Culturas - LQARS (2022). É importante destacar que a contribuição da matéria orgânica do castanheiro pode ser limitada devido à lenta decomposição das suas folhas, como referido por Rodrigues & Arrobas (2020).

O teor de azoto total foi superior em Salgueiros ($1,34 \text{ g kg}^{-1}$), o que pode estar associado a uma maior atividade microbiana e menor lixiviação em solos de maior altitude. Em contraste, Parada apresentou menores teores de azoto ($0,62 \text{ g kg}^{-1}$), provavelmente devido ao maior stress hídrico e sazonalidade mais acentuada.

As bases de troca, incluindo cálcio, magnésio, potássio e sódio, contribuem significativamente para a Capacidade de Troca Catiónica (CTC) do solo. Apesar de ligeiramente superiores em Parada ($6,53 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$), ambos os locais apresentaram valores de CTC relativamente baixos. Esta baixa capacidade pode indicar uma menor disponibilidade de nutrientes para as plantas e uma necessidade de práticas de manejo que aumentem a fertilidade do solo, como a adição de matéria orgânica ou calcário.

Em resumo, o solo de Parada, menos ácido e com teores mais elevados de carbono orgânico e bases de troca, demonstra uma fertilidade potencialmente maior. No entanto, a sua vulnerabilidade ao stress sazonal e hídrico sugere a necessidade de um manejo mais intensivo. Já Salgueiros, com solos mais ácidos e menor teor de carbono, apresenta uma maior estabilidade climática e de nutrientes, mas com menor fertilidade potencial.

4.2 Atividade biológica do solo

Os parâmetros biológicos do solo, incluindo carbono e azoto da biomassa microbiana (C_{mic} e N_{mic}), a relação C_{mic}/C_{org} , respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico (qCO_2), foram quantificados e estão resumidos na Tabela 2. Os resultados revelam variações sazonais nas duas áreas estudadas, Parada e Salgueiros. Estes parâmetros são indicadores cruciais para a compreensão dos ciclos de nutrientes e para a avaliação da saúde dos ecossistemas (Hoffmann et al., 2018).

A dinâmica do carbono imobilizado na biomassa microbiana (C_{mic}) variou ao longo das estações. Em Parada, local com menor altitude, apresentou um valor superior na primavera ($468,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e menor no outono ($102,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Em Salgueiros, as variações ocorridas ao longo do ano foram menores não podendo as diferenças observadas serem consideradas significativas entre estações. Deste modo, Salgueiros demonstrou uma maior estabilidade sazonal na atividade microbiana.

Em relação ao N_{mic} , Parada apresentou maior concentração no verão (105,4 mg kg⁻¹), decaindo no outono (41,4 mg kg⁻¹), enquanto Salgueiros teve o seu pico no outono (66,9 mg kg⁻¹).

Nota-se que a proporção C_{mic}/C_{org} é um indicador da qualidade do carbono no solo, sendo mais elevada na primavera, o que sugere um ambiente propício ao crescimento microbiano e uma maior proporção de matéria orgânica lábil (Moscatelli et al., 2005). A elevada relação C_{mic}/C_{org} , mesmo em solos com menor teor de C_{org} , indica uma disponibilidade significativa de substratos para os microrganismos (Cheng et al., 2013).

A RBS, que reflete a atividade microbiana global, acompanhou um padrão similar em ambas as áreas, com os menores valores observados no verão, potencialmente devido a temperaturas mais elevadas e menor disponibilidade de água, o que concorda com os estudos de Veronezi et al. (2020) que, estudaram a RBS sob três diferentes coberturas vegetais no Paraná. A recuperação da RBS no outono evidencia a resiliência da comunidade microbiana.

Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana (C_{mic}), azoto da biomassa microbiana (N_{mic}), quociente microbiano (C_{mic}/C_{org}), Respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico (qCO_2) em amostras do solo de Parada e Salgueiros

Local	Estação	C_{mic} (mg kg ⁻¹)	N_{mic} (mg kg ⁻¹)	C_{mic}/C_{org} (%)	RBS mg C-CO ₂ kg ⁻¹ solo h ⁻¹	qCO_2 mg C-CO ₂ g ⁻¹ C _{mic} h ⁻¹
Parada	Primavera	468,4±96,9 ^a	n.d	2,5±0,5 ^a	29,2±2,2 ^{ab}	64,2±13,2 ^{cd}
	Verão	212,6±74,3 ^{bc}	105,4±51,5 ^a	1,1±0,4 ^b	15,2±2,6 ^c	75,8±21,0 ^{cd}
	Outono	102,4±15,8 ^c	41,4±9,6 ^b	0,5±0,1 ^b	23,9±3,5 ^b	234,1±15,0 ^a
Salgueiros	Primavera	287,0±51,2 ^b	nd	2,4±0,4 ^a	30,2±1,8 ^{ab}	107,9±21,1 ^b
	Verão	337,1±36,5 ^{ab}	56,9±20,2 ^{ab}	2,8±1,0 ^a	11,6±1,0 ^c	37,3±11,6 ^d
	Outono	184,0±17,7 ^{bc}	66,9±13,3 ^{ab}	1,7±0,3 ^{ab}	30,4±4,7 ^a	160,4±42,1 ^b

Nota: Letras diferentes por coluna indicam diferenças significativas (p<0,05); n.d – não determinado.

O quociente metabólico (qCO_2) mostrou variações sazonais significativas. Em Parada, no outono observaram-se valores significativamente mais elevados (234,1 mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹), enquanto na primavera e verão foram observados valores mais baixos (64,2 e 75,8 mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹, respetivamente) neste local. Em Salgueiros, o qCO_2 foi idêntico na primavera (107,9 mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹) e outono (160,4 mg C-CO₂ g⁻¹

$C_{mic} h^{-1}$), sendo menor no verão ($37,3 \text{ mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} C_{mic} h^{-1}$). De acordo com os estudos de (Silva *et. al.* 2010) valores mais baixos de quociente metabólico estão geralmente associados a ecossistemas mais estáveis e maduros e valores mais altos refletem uma diminuição da eficiência da biomassa microbiana, sugerindo que a actividade microbiana do solo foi menos eficiente no uso do carbono e que os organismos estão em stress. Assim, analisando estes dois locais podemos afirmar que o solo de Salgueiros representa um ecossistema mais estável, pelos baixos valores do qCO_2 observados.

Em resumo, os dados revelam variações sazonais nas propriedades da biomassa microbiana do solo em ambos os locais, com valores geralmente mais altos na primavera e quedas durante o verão e o outono. Além disso, Salgueiros tende a apresentar concentrações mais elevadas de C_{mic} e N_{mic} no verão e outono. A análise detalhada destes dados é importante para entender as dinâmicas da biomassa microbiana do solo nessas regiões ao longo das estações do ano, o que pode ser crucial para a gestão agrícola e ambiental.

4.3 Caracterização da comunidade microbiana

4.3.1 Quantificação de bactérias e fungos

A quantidade de fungos e bactérias, por grama de solo seco, nos dois sotos demonstração (Parada e Salgueiro) está apresentada na Tabela 3.

A variação observada na abundância bacteriana entre as estações, com maior abundância no outono, poderá ser explicada pelas diferenças na humidade do solo, que é tipicamente mais elevada no outono. Por outro lado, a maior altitude a que se encontra o SD de Salgueiros poderá explicar a menor variação desta população entre estações.

No estudo conduzido por Diegues *et al.* (2019), constataram-se diferenças significativas entre as áreas em análise, nomeadamente nas populações microbianas. Foi evidenciada uma predominância de fungos em comparação com bactérias, sendo esta tendência mais acentuada em Salgueiros, um padrão que se assemelha aos resultados do presente estudo. Os autores postulam que tal diferença pode estar vinculada aos antecedentes agrícolas de cada local, com Salgueiros caracterizado por um passado de cultivo cerealífero, enquanto Parada era uma zona florestal povoada por pinheiros. Leite (2022) considera que a distribuição dos microrganismos do solo é susceptível a ser influenciada por variações de pH, humidade, temperatura, profundidade do solo e

densidade de matéria orgânica, bem como pelos impactos resultantes de intervenções antrópicas.

Tabela 3. População de bactérias e fungos dos solos (log UFC/g de solo seco).

Local	Estação	Bactérias	Fungos
Parada	Primavera	4,68 ± 0,65 ^{abc}	4,88 ± 0,36 ^{ab}
	Verão	3,63 ± 0,83 ^d	5,20 ± 0,15 ^a
	Outono	5,54 ± 0,15 ^a	4,72 ± 0,08 ^b
Salgueiros	Primavera	4,03 ± 0,77 ^{cd}	4,95 ± 0,19 ^{ab}
	Verão	4,32 ± 0,28 ^{bcd}	5,26 ± 0,05 ^a
	Outono	5,32 ± 0,14 ^{ab}	5,24 ± 0,35 ^a

Letras minúsculas por coluna indicam diferenças significativas entre estações e entre SD pelo Teste de Turkey ($p < 0,05$).

4.3.2 Composição da comunidade bacteriana

Na Figura 12, apresenta-se um resumo da composição bacteriana de dois soutos estudados, revelando variações nas famílias bacterianas conforme a época do ano e as áreas analisadas.

As famílias Acidobacteraceae e Xanthobacteraceae foram as mais frequentes e com maior ocorrência em ambas as áreas e nas três épocas avaliadas. Embora estas duas famílias sejam predominantes nos dois soutos, podemos observar que a família Acidobacteraceae é mais abundante em Parada na época da primavera e no outono, e a família Xanthobacteraceae mais abundante em Salgueiros no período da primavera e do verão. A primeira família, Acidobacteriaceae, tem a capacidade de degradar compostos de carbono simples, assim como polissacarídeos vegetais e microbianos, incluindo a celulose. É uma família extremamente abundante e diversificada, encontrada principalmente em ambientes ácidos (Campbell, 2014), o que confirma os resultados encontrados para Salgueiros que apresenta um pH mais ácido e menor disponibilidade de C_{org} (Tabela 1). A Xanthobacteraceae, segunda família mais abundante, possui géneros com capacidade de quimiolitotrofia facultativa, ou seja, fixam N_2 e vivem em associação com plantas leguminosas (Oren, 2014). A abundância da família

Xanthomonadaceae foi também observada por Campbell et al. (2010) como resposta à fertilização a longo prazo.

A família Sphingomonadaceae não é conhecida por desempenhar papel patogênico, apesar de possuir uma espécie que é patogênica de plantas (*S. suberifaciens*). Alguns gêneros têm capacidade antagônica contra patógenos de plantas, além de estimular a promoção do crescimento de plantas. Muitas espécies dessa família também podem degradar compostos xenobióticos (Glaeser & Kampfer, 2014).

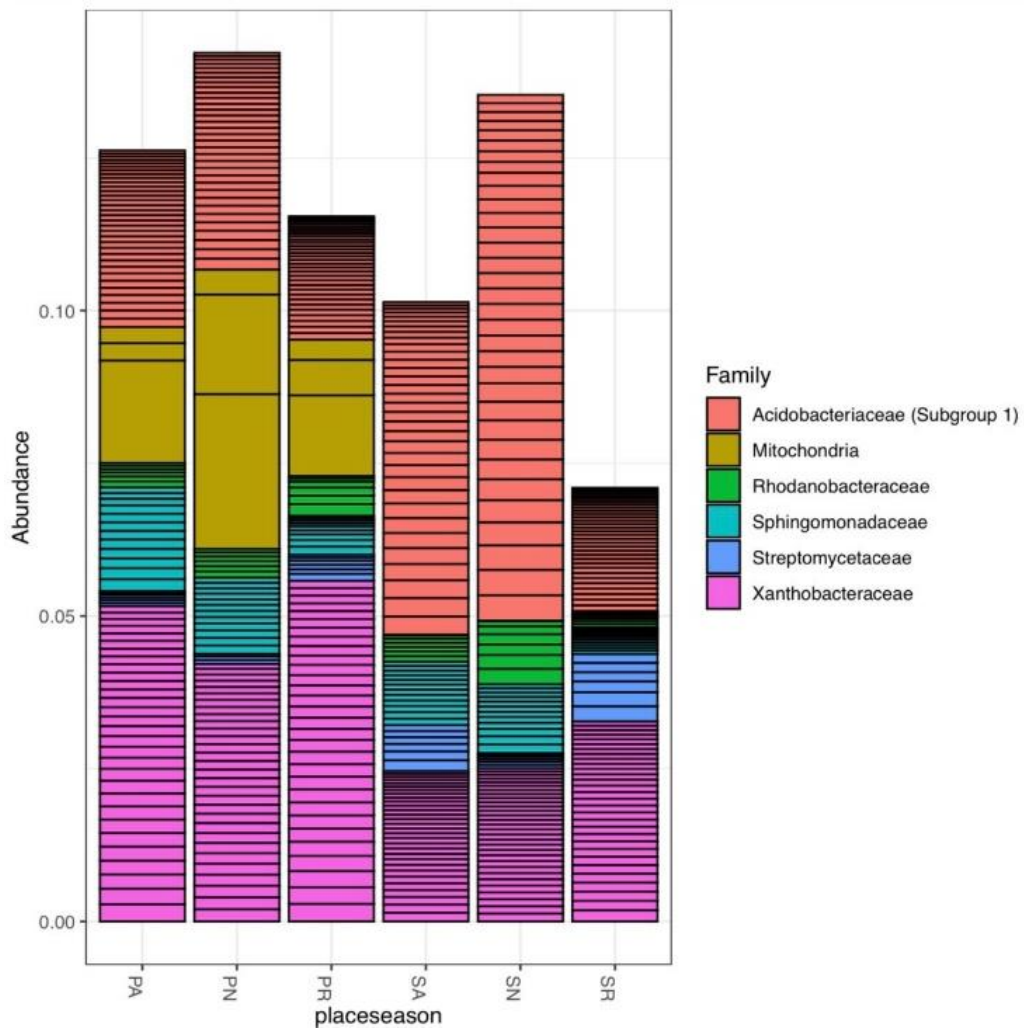


Figura 12-Composição da comunidade bacteriana nos dois locais estudados nas diferentes estações do ano (SR- Salgueiros no período do outono, SN- Salgueiros no período do verão, SA- Salgueiros no período da primavera, PR- Parada no período do outono, PN- Parada no período de verão, PA- Parada no período da primavera).

4.3.3 Composição da comunidade fúngica

A composição das famílias fúngicas variou conforme a estação do ano e a área estudada. A família Trimorphomycetaceae foi a mais frequente e abundante em todas os locais e épocas do ano estudados, incluindo primavera (PA), verão (PN) e outono (PR). A família Cladosporiaceae marcou presença em todas as áreas e épocas do ano. Dothideomycetes_fam_incertae_sedis foi encontrado em maior abundância em Parada nas estações avaliadas. Pleosporales_fam_incertae_sedis, Pleosporaceae e Phaeosphaeriaceae foram as famílias encontradas somente em Parada, onde, durante a primavera, foi encontrada apenas a família Pleosporaceae. A família Dothioraceae, presente somente em Parada nas três estações, reforça a maior diversidade fúngica deste local.

A família Trimorphomycetaceae é adaptável a diversos ambientes, o que pode justificar sua predominância em diferentes locais. Esses fungos têm a capacidade de se adaptar a condições ambientais variadas, o que lhes confere uma vantagem competitiva sobre outras espécies de fungos. Esta adaptabilidade pode ser relacionada à sua fisiologia, capacidade de sobreviver em diferentes faixas de pH, temperaturas, e disponibilidade de nutrientes. (Felix et al. 2017)

A constante presença da família Cladosporiaceae em todas os locais e épocas estudadas, pode ser justificada pelas características adaptativas destes fungos. Membros desta família (*Cladosporium* spp.) são frequentemente encontrados em vários ambientes terrestres, como por exemplo no solo, caves e ambientes marinhos (Lee et al., 2023). A presença exclusiva da família Pleosporaceae na primavera pode estar relacionada às condições ambientais específicas dessa estação, como mudanças na temperatura, humidade e a disponibilidade de substratos orgânicos. Esses fatores criam um ambiente ideal para o crescimento desses fungos. Além disso, a primavera é uma época de renovação da vegetação, o que pode influenciar a microbiota do solo, incluindo a presença de fungos específicos como Pleosporaceae, que podem ter relações simbióticas ou parasitárias com plantas emergentes (Teifoori et al. 2019)

A maior diversidade fúngica observada na família Dothioraceae, como destacado nas análises, pode ser atribuída às características adaptativas e ecológicas desta família. Dothioraceae, é uma família conhecida por ser amplamente distribuída e adaptável a vários ambientes, incluindo solos, folhas e árvores. A capacidade desses fungos de viverem como endófitos e sua utilidade como micoherbicidas sugerem uma forte

adaptabilidade ecológica, facilitando sua dominância em diversos ecossistemas. (García et al. 2012)

A constatação de uma menor diversidade de fungos em Salgueiros relativamente à Salgueiros poderá ser interpretada à luz das características específicas do solo e da composição da matéria orgânica. Refira-se que o histórico do uso do solo é diferente nos dois locais estudados (cereal em Salgueiros e floresta de pinheiro em Parada).

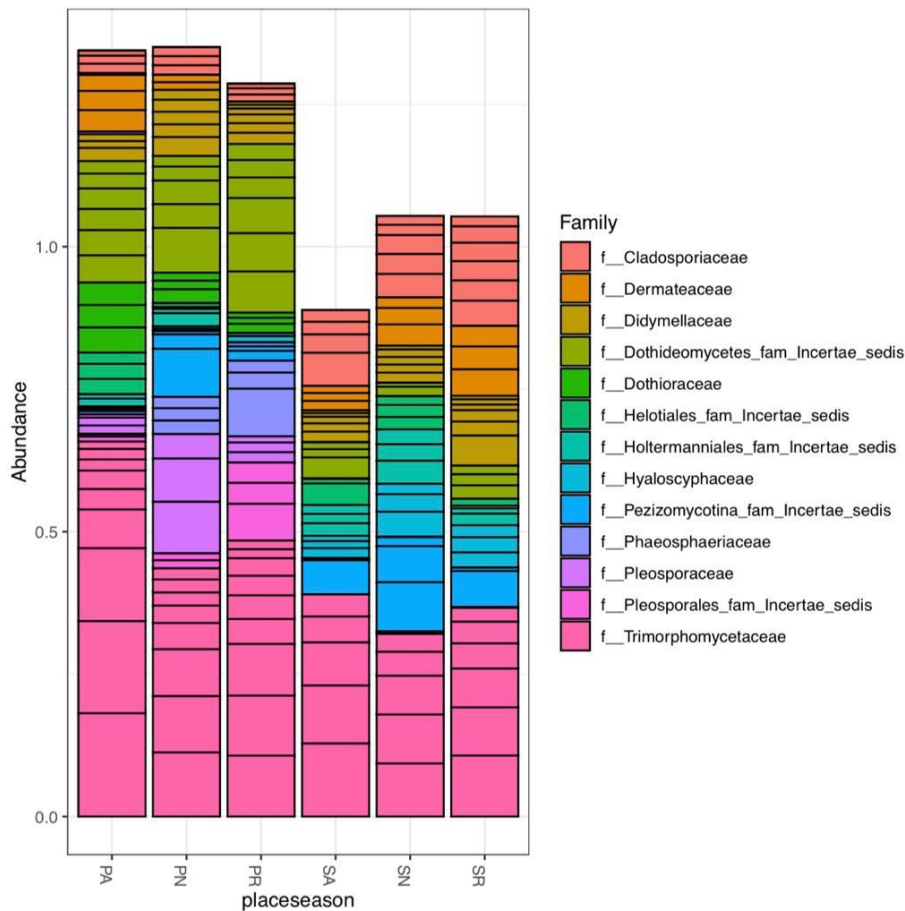


Figura 13- Composição da comunidade fúngica nos dois locais estudados nas diferentes estações do ano (SR- Salgueiros no período do outono, SN- Salgueiros no período do verão, SA- Salgueiros no período da primavera, PR- Parada no período do outono, PN- Parada no período de verão, PA- Parada no período da primavera).

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que as propriedades químicas do solo, como o pH e o teor de carbono orgânico, variaram significativamente entre as áreas de estudo, Parada e Salgueiros. Estas diferenças refletiram-se diretamente na abundância e na composição das comunidades microbianas (bacterianas e fúngicas). Factores como o histórico de uso do solo, as diferenças de altitude e outras condições edafoclimáticas foram determinantes para explicar estas variações nos parâmetros microbiológicos.

No que respeita aos fungos, observou-se uma maior abundância em Salgueiros em comparação com Parada. Relativamente às bactérias, em Parada verificou-se uma variação sazonal marcada, enquanto em Salgueiros as populações bacterianas apresentaram maior estabilidade ao longo das estações.

As famílias bacterianas Acidobacteraceae e Xanthobacteraceae foram as mais frequentes e predominantes em ambas as áreas e ao longo das três estações analisadas. A família Acidobacteraceae dominou em Salgueiros, especialmente na primavera e no verão, devido ao solo mais ácido. Em contrapartida, a família Xanthobacteraceae foi dominante em Parada, independentemente da estação.

Na composição da comunidade fúngica, a família Trimorphomycetaceae revelou-se predominante em ambos os locais e ao longo de todas as estações. A maior diferenciação entre os locais ocorreu nas famílias Dothioraceae e Dothideomycetes_fam_incertae_sedis, enquanto as famílias Pleosporaceae e Phaeosphaeriaceae foram encontradas exclusivamente em Parada, sugerindo uma associação com solos menos ácidos e maior variabilidade sazonal.

Os resultados indicam que as condições edafoclimáticas, particularmente o pH e a altitude, têm um impacto significativo na estabilidade e na diversidade das comunidades microbianas. Além disso, a influência sazonal na atividade microbiana foi mais pronunciada em Parada, refletindo a maior vulnerabilidade deste local ao stress ambiental.

Para obter conclusões mais robustas e compreender melhor a dinâmica destas comunidades microbianas, recomenda-se a extensão do período de análise ao longo de vários anos. Estudos futuros deverão também explorar o impacto de diferentes práticas de gestão do solo, como a adição de matéria orgânica e estratégias manejo do solo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguin-Pombo, D., & Franquinho-Aguiar, A. M. (Eds.). (2018). *A cultura do castanheiro na Madeira: Manual Prático*. Universidade da Madeira.
- Alkorta, I., Elpede, L., & Garbisu, C. (2017). Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx200>.
- Arrobas, M., Afonso, & Rodrigues, M. A. (2020). Large Chestnut Trees (*Castanea sativa*) Respond Poorly to Liming and Fertilizer Application. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20, 1261–1270. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00210-4>.
- Balbino, L. R. (1968). La méthode Egner-Riehm et la détermination du phosphore et du potassium «assimilável» des sols du Portugal. In *II Col. Mediterrâneo Contrl. Fert. Plantas Cultivadas* (pp. 55–65).
- Berghäll, S., Hilditch, S., Penttilä, M., & Richard, P. (2007). Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP (+): d-xylose dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 277, 249–253.
- Boddy, L. (2013). Host shifts in fungi caused by climate change? *Fungal Ecology*, 4, 184–190.
- Campbell, B. J. (2010). The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental Microbiology*, 12, 1842–1854.
- Campbell, B. J. (2014). The family Acidobacteriaceae. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea* (pp. 405–415). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Cardoso, E. J. B. N., & Andreote, F. D. (2016). *Microbiologia do solo* (2ª ed.). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Cheng, F., Peng, X., Zhao, P., Yuan, J., Zhong, C., Cheng, Y., et al. (2013). Soil Microbial Biomass, Basal Respiration and Enzyme Activity of Main Forest Types in the Qinling Mountains. *PLoS ONE*, 8(6), 67–353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067353>.
- Classen, A., Sundqvist, M., Henning, J., Newman, G., Moore, J., Cregger, M., Moorhead, L., & Patterson, C. (2015). Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: What lies ahead? *Ecosphere*, 6, 130. <https://doi.org/10.1890/ES15-00217.1>. Acedido em 12 de setembro de 2022.
- Diegues, S., Pereira, E., Afonso, S., & Patrício, M. S. (2019). Estudo comparativo da microbiologia do solo em soutos demonstração: contributo para o desenvolvimento de estratégias de adaptação sustentáveis. In *Proceedings of the 5th Ibero-American Congress on Entrepreneurship, Energy, Environment and Technology (CIEEMAT)* (pp. 319–323).

- Ebeling, A. G., Anjos, L. H. C., Perez, D. V., Pereira, M. G., & Valladares, G. S. (2008). Relação entre a acidez e outros atributos químicos em solos com teores elevados de matéria orgânica. *SciELO*, 67, 429-439.
- FAOSTAT (2022). *Database of Agricultural Statistics*. <https://www.fao.org/faostat/en/>. Acedido em 18 de dezembro de 2022.
- Felix, C. R., Navarro, H. M. C., Paulino, G. V. B., Broetto, L., & Landell, M. F. (2017). *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. nov. and *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov., two tremellaceous yeasts isolated from bromeliads in north-eastern Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 6, 1752-1757.
- Food and Agriculture Organization [FAO]. (2015). *Estado mundial da pesca e aquicultura 2014*. <https://www.fao.org/3/i3794en/i3794en.pdf>. Acedido em 2 de novembro de 2022.
- Freitas, T. R., Santos, J. A., Silva, A. P., & Fraga, H. (2021). Influence of Climate Change on Chestnut Trees: A Review. *Plants*, 10, 1463. <https://doi.org/10.3390/plants10071463>. Acedido em 22 de fevereiro de 2023.
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2014). A família *Sphingomonadaceae*. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 641-707). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_260. Acedido em 1 de abril de 2023.
- Gonçalves, P. (2021). Os novos desafios do souto no contexto das alterações climáticas. <https://inovacao.rederural.gov.pt/grupos-operacionais/13-projectos-grupos-operacionais/57-climcast>. Acedido em 5 de abril de 2022.
- Hernandez, E. G. P. (2019). *Impact of ohmic heating and high-pressure processing on chestnut (Castanea sativa Mill.) properties* [Tese de doutoramento, Universidade do Minho].
- Hoffmann, R. B., Moreira, E. E. A., Hoffmann, G. S. S., & Araújo, N. S. F. (2018). Effect of soil management on microbial biomass carbon. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 1, 168-178.
- INMG. (1991). *O clima de Portugal. Normais climatológicos da região de “Trás-os-Montes e Alto Douro e Beira Interior”*, 1951-1980.
- IPMA I.P. (2021). *Normal Climatológica – Bragança 1981-2010* (Versão: 2.1). Instituto Português do Mar e da Atmosfera I.P. <https://www.ipma.pt>. Acedido em 20 de julho de 2022.
- ISO 16072. (2002). *Soil quality — Laboratory methods for determination of microbial soil respiration*. <https://www.iso.org/standard/29015.html>. Acedido em 12 de março de 2023.
- Lee, W., Kim, J. S., Seo, C. W., Lee, J. W., Kim, S. H., Cho, Y., & Lim, Y. W. (2023). Diversity of Cladosporium (Cladosporiales, Cladosporiaceae) species in marine

- environments and report on five new species. *MycKeys*, 98, 87–111. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.98.101918>.
- Leite, M. B. A. (2022). Biologia do solo. *Ambiente Brasil*. https://ambientes.ambientebrasil.com.br/agropecuário/artigo_agropecuário/biologia_do_solo.html. Acedido em 9 de setembro de 2021.
- Ma, J., Nergui, S., Han, Z., Huang, G., Li, H., Zhang, R., Zhu, L., & Liao, J. (2019). The Variation of The Soil Bacterial and Fungal Community Is Linked to Land Use Types. *Sustainability*, 11, 3286. <https://doi.org/10.3390/su11093286>.
- Maynard, K. M., Baier, A. E., Newhouse, S. A., Merkle, C. J., Nairn, L., Kong, J. E., Carlson, C., Addo-Quaye, M. E., Staton, F. V., & Hebard, L. L. (2008). The Forest Health Initiative, American chestnut (*Castanea dentata*) as a model for forest tree restoration: biological research program. *Acta Horticulturae*, 1019, 179-189.
- Mello, F. A., Sobrinho, M. O. C., Arzola, S., Silveira, R. I., Neto, A., & Kiehl, J. (1983). *Fertilidade do solo*.
- Mendes, I. C., Hungria, M., Bueno, R. J. F., Ferreira, M. F., Chaer, G. M., Mercante, F. M., & Zilli, E. J. (2009). Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais: Utopia ou realidade? *Embrapa*, 246, 31.
- Moscatelli, M., Lagomarsino, A., Marinari, S., De Angelis, P., & Grego, S. (2005). Structural and functional diversity of soil microbes is affected by elevated [CO₂] and N addition in a poplar plantation. *Plant and Soil*, 7, 399-405.
- Oren, A. (2014). A Família Xanthobacteraceae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 1061-1084). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_49. Acedido em 23 de maio de 2023.
- Patrício, M. S. F. (1996). *Análise do crescimento da fase juvenil de um ensaio de densidade de varas numa talhadia de castanheiro* [Tese de Mestrado em Produção Vegetal, ISA – UTL].
- Patrício, M. S., Nunes, L., & Monteiro, M. L. (2020). Does the application of silvicultural management models drive the growth and stem quality of sweet chestnut coppices towards sustainability? *New Forests*, 51, 615–630. <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09741-4>.
- Pereira, E., Santos, S. A. P., Arrobas, M., Claro, A. M., Magalhães, A. L., & Patrício, M. S. (2011). Microbial biomass and N mineralization in mixed plantations of broadleaves and nitrogen-fixing species. *Forest Systems*, 20, 16-524. <https://doi.org/10.5424/fs/20112003-9067>.
- Pereira, E., Santos, S. A. P., Arrobas, M., Claro, A. M., Magalhães, A. L., & Patrício, M. S. (2010). Microbial biomass and N mineralization in mixed plantations of broadleaves and nitrogen-fixing species. In *Mixed and Pure Forests in a Changing World; IUFRO Conference*. Vila Real.

- Perez, K. S. S., Ramos, M. L. G., & Mcmanus, C. (2004). Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. *Pesq. agropec. bras*, 39, 567-573. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000300017>.
- Perez, K. S. S., Ramos, M. L. G., & Mcmanus, C. (2005). Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 40, 137-144. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000100014>.
- Reeuwijk, V. (2002). *Procedures for soil analysis* (6th ed.). ISRIC-FAO. https://www.isric.org/sites/default/files/ISRIC_TechPap09.pdf. Acedido em 18 de abril de 2022.
- Reis Junior, F. B. dos, & Mendes, L. de C. (2007). Biomassa Microbiana do Solo. *Embrapa*, 205, 17-31.
- Rodrigues, M. A., & Arrobas, M. (2020). *Gestão do solo = Gestión del suelo*. In A. Bento & A. C. Ribeiro (Eds.), *Manual de Boas Práticas do Castanheiro* (pp. 119-129). Bragança, Portugal: Comunidade Intermunicipal das Terras de Trás-os-Montes. ISBN 978-989-33-1088-5. Disponível em <http://hdl.handle.net/10198/26947>. Acesso em 2 de novembro de 2022.
- Silva, E., & Azevedo, S. (2007). *Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C)*. Embrapa, 98, 2-6.
- Silva, R. R., Silva, M. L. N., Cardoso, E. L., Moreira, F. M. de S., Curi, N., & Alovisi, A. M. T. (2010). Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes – MG. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 1585-1592.
- Silveira, A. P. D., & Freitas, S. (Eds.). (2007). *Microbiota do solo e qualidade ambiental* (1ª ed.). Campinas: Instituto Agrônômico, 166-179. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100937/1/2007CL-001.pdf>. Acedido em 10 de agosto de 2022.
- Simões, S. M. O., Zilli, J. E., Costa, M. C. G., Tonini, H., & Balieiro, F. C. (2010). Carbono orgânico e biomassa microbiana do solo em plantios de *Acacia mangium* no Cerrado de Roraima. *Acta Amazonica*, 40, 23-30. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000100004>. Acedido em 15 de setembro de 2022.
- Sparling, G. P., & West, A. W. (1988). A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 337-343.
- Teifoori, F., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., & Martinez, J. (2019). Gene profiling and expression of major allergen Alt a 1 in *Alternaria alternata* and related members of the Pleosporaceae family. *Revista Iberoamericana de Micología*, 36, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.05.004>.

- Valentini, C. M., Gonçalves, A. J., & Gomes, P. F. R. A. (2015). Respiração do solo como bioindicador em áreas degradadas. *Revista Internacional de Ciências*, 5.
- Veronezi, L. F., Ghizelini, A. M., Marcelino, V. R., Lombardi, K. C., Martins, K. G., & Hanke, J. (2020). Soil basal respiration under three different vegetation covers in Paraná. *Ciência e Natura*, 42. <https://doi.org/10.5902/2179460X42589>.