



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
MOLECULAR)

**O IMPACTO DOS CUPINS *SYNTERMES WHEELERI* NA MICROBIOTA DO SOLO
DO CERRADO**

HELENA IPÊ PINHEIRO GUIMARÃES

BRASÍLIA-DF
2020

HELENA IPÊ PINHEIRO GUIMARÃES

**O IMPACTO DOS CUPINS *SYNTERMES WHEELERI* NA MICROBIOTA DO SOLO
DO CERRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Molecular nos conformes do Artigo 51, parágrafo 5º do regulamento da PPGBIOMOL.

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger

BRASÍLIA-DF

2020

À ciência e pesquisa brasileiras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Professoras que aceitaram o convite para participação da banca. Desde o início do trabalho já pensava em convidá-las pela sua contribuição e admiração que tenho. Espero um dia ser professora e me espelho em vocês: Professora Eliane, Professora Cristine e Professora Mercedes, obrigada.

Agradeço ao meu orientador Professor Ricardo Krüger, que me recebeu no laboratório de braços abertos e foi comigo não só para a bancada como para o campo e me acompanhou durante esses dois anos. Obrigada pela paciência e ensinamentos, Professor!

Renata, que foi minha co-orientadora durante o trabalho, me ajudou muito com a parte de bancada, bioinformática, revisão de pôsters, abstracts, projetos e tudo que eu precisei. Muito obrigada, Rê! Agradeço também a todos do laboratório, esse trabalho não seria possível sem vocês. Tayná, Philippe, Jéssica, Brendo, vocês que chegaram por último e me ajudaram a dar o gás que eu precisava. Regina, obrigada por todos os ensinamentos e por tudo que você e o pessoal da Ecologia fizeram por mim. Rafa e Otávio, vocês foram as pessoas que mais me ajudaram a interpretar os meus dados, quando eu achei que não tinha nada, vocês me mostraram que não ter nada às vezes é tudo. Obrigada, pessoal.

Família e amigos, vocês me mantiveram firme durante todo esse percurso. Não seria possível ter feito isso sem o apoio de vocês. Mãe, você sempre foi minha maior inspiração. Você me ajudou psicologicamente pra esse mestrado, sempre me ouviu e me ajudou quando eu precisei. Obrigada mãe. Pai, você e a sua paixão pelo quintal e as plantas foram um norte pra mim. Eu percebi no meio do caminho o quanto de você tinha nesse trabalho e espero ter honrado isso. Bela, muito obrigada pelo apoio durante esses anos.

Parte desse trabalho também foi feito em conjunto aos meus companheiros de estudo, Luna e Miguelito. Luna se formou comigo em Biotecnologia e Miguelito só participou nesse finalzinho de mestrado, mas sempre ao meu lado e me dando suporte. Obrigada pessoal. Gabi, minha amiga desde a Biotec, minha parceira para todas as horas. Me apresentou o grupo de amizades que mais me acompanhou nesse processo e também o meu companheiro, Gabriel.

Por fim, agradeço às empresas de fomento que me permitiram auxílio financeiro, CNPq, que financiou a execução deste trabalho, à FAPDF, que me forneceu auxílio para ir à Alemanha no ISME, simpósio que mudou o rumo da minha pesquisa, e à Biologia Molecular da UnB, que me forneceu financiamento para meu último congresso em Boston.

Agradeço à mim e a minha fé por ter ido até o final. Obrigada!

“Quem tem amigos, tem tudo.”

Ditado popular.

RESUMO

GUIMARÃES, HELENA IPE (HIPG). “O impacto dos cupins *Syntermes wheeleri* na microbiota do solo do cerrado” (64). Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2020.

Os cupins são conhecidos como os “engenheiros” do ecossistema e possuem grande impacto nos biomas de savana. Em algumas savanas tropicais áridas ou semi-áridas, os cupins são os únicos invertebrados ativos capazes de decompor matéria orgânica durante a estação seca. Dentro das suas atividades como animais eusociais, os cupins constroem ninhos no solo, os cupinzeiros, com a finalidade de proteger a colônia. O manejo do solo por esses animais pode resultar em uma variação nos parâmetros físicos e químicos em relação ao solo adjacente. O cerrado é o segundo maior bioma no Brasil e é caracterizado por ser um ecossistema de savana, com invernos secos e verões chuvosos. Os cupins são particularmente abundantes nessa região, com cerca de 140 espécies registradas e, entre essas, uma grande diversidade de espécies de cupins endêmicos, como o *Syntermes wheeleri*. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota do solo do cupinzeiro da espécie *S. wheeleri* em região de cerrado a fim de avaliar a composição e diversidade bacteriana desse solo em relação ao solo adjacente. Para isso, o solo do cupinzeiro foi coletado em duas profundidades: 60cm e o seu topo(0cm), e o do cerrado a 60 cm na fotofisionomia do campo sujo para extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA. Os filos mais abundantes entre os solos foram: Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chloroflexi e Planctomycetes. A abundância relativa de Proteobacteria e Actinobacteria foi maior para as amostras de solo do cupinzeiro. A análise de coordenada principal separa as amostras de solo como três amostras distintas em relação a comunidade bacteriana. O solo mais rico é o solo do campo sujo na estação seca. No entanto, a análise de inferência funcional a partir da taxonomia aponta para uma redundância funcional entre as amostras. O conteúdo de nitrato para as amostras de solo coletadas no topo do cupinzeiro (0-10cm) foram maiores do que em relação as amostras de solo coletadas no campo sujo (50-60cm) e o pH foi menos ácido para as amostras coletadas no no cupinzeiro profundo (50-60cm) do que em relação às amostras de solo coletadas no topo (0-10cm). A umidade possui efeito na distribuição da comunidade e da diversidade bacteriana e a análise de número de OTUs observados para as amostras de solo indica que a riqueza bacteriana do campo sujo é mais susceptível a mudança da sazonalidade do que as amostras do cupinzeiro, que pode ser uma consequência do papel protetor do cupinzeiro para a colônia de cupins.

Palavras chaves: cupinzeiro; cerrado; diversidade; microbiota.

ABSTRACT

The termites are known as ecosystem “engineers” and have a great impact on savana biomes. In arid or semi-arid tropical savanas, the termites are the only active invertebrates able to decompose organic matter during the dry season. As eusocial animals, the termites build their nest in the soil, the mounds, with the purpose of protecting the colony. The soil manipulated by these animals can result in a physical and chemical variation in regard to the adjacent soil. The cerrado is the second biggest biome in Brasil and is characterized as a savanna biome, with dry winters and wet summers. The termites are particularly abundant in this region, with 140 estimated species and, among those, a great variety of endemic termite species, such as the *Syntermes wheeleri*. The main objective of this work is to characterize the soil microbiota of the soil associated to the termite mound of the *S. wheeleri* specie in the cerrado region in order to evaluate the bacterial composition and diversity in comparison to the adjacent soil. Thus, the mound soil was collected at two different depths: 50-60 cm and its peak (0-10cm), and the cerrado at 50-60 cm at the campo sujo phytophysiology for DNA exctration and 16S rRNA gene sequencing. The most abundant phyla between the soil samples were: Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chloroflexi and Planctomycetes. The relative abundance of Proteobacteria and Actinobacteria was greater for the mound soil samples. The principal coordinate analysis separated the samples as three different samples in regard to the bacterial community. The richest soil is the campo sujo at the dry season. However, the functional inference analysis based on taxonomy indicates functional redundancy. The nitrate content from the soil collected at the mound peak (0-10cm) is higher than the campo sujo soil (50-60cm) and the pH is higher for the soil collected deeper within the mound (50-60cm) than the peak (0-10cm). The humidity has an effect over the community distribution and diversity and the observed OTUs analysis shows that the bacterial richness of the campo sujo samples is more susceptible to seasonality changes than mound samples, which can be a consequence of the protective role of the mound to the termite colony.

Key words: mound; cerrado; diversity; microbiota.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fitofisionomia campo sujo em área de cerrado e local de coleta das amostras de solo no IBGE em 2017 e 2018. 17
- Figura 2.** Dados da precipitação mensal de julho de 2017 à Março de 2018 em Brasília disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 23
- Figura 3.** Abundância relativa dos filos bacterianos abundantes para as amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60 cm) na estação seca de 2017. 27
- Figura 4.** Abundância relativa dos filos bacterianos raros de 1% para as amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca de 2017. 28
- Figura 5.** Análise de ‘heatmap’ da disposição dos filos bacterianos de acordo com a sua abundância relativa para amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca de 2017. 29
- Figura 6.** Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca de 2017. 30
- Figura 7.** Valor do índice de Shannon para diversidade bacteriana das amostras de solo de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm), coletados no IBGE em Brasília, 2017 e 2018. 31
- Figura 8.** Análise de coordenada principal (PCoA) dos dados de inferência funcional das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm). 31
- Figura 9.** Análise dos dados de nitrato [N-NO₃] das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018. 33
- Figura 10.** Análise dos dados de amônio [N-NH₄] das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018. 34
- Figura 11.** Análise dos dados de pH das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018. 34

Figura 12. Análise de componente principal dos parâmetros das amostras de solo e campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE, Brasília em 2017 e 2018.....	35
Figura 13. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da comunidade bacteriana das amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) em relação à umidade medida das estações seca, transição e chuva em 2017 e 2018.....	36
Figura 14. Análise de regressão linear entre os filos bacterianos mais abundantes para as amostras de campo sujo e cupinzeiro na estação chuvosa em relação a umidade.....	37
Figura 15. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na transição de 2017.....	38
Figura 16. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação chuvosa de 2018.....	38
Figura 17. Curva de alpha-rarefação do número de OTUs observadas nas estações da seca, chuva e a transição do solo coletado em área de campo sujo (60cm), solo de cupinzeiro na superfície (0cm) e solo do cupinzeiro profundo (60cm) no IBGE, Brasília no ano de 2017 e 2018.....	39
Figura 18. Curva de alpha-rarefação do número de OTUs observadas para o solo coletado em área de campo sujo (60cm), solo de cupinzeiro na superfície (0cm) e solo do cupinzeiro profundo (60cm) no IBGE, Brasília no ano de 2017 e 2018.....	40
Figura 19. Análise do valor do número de OTUs observados para as amostras de solo coletado em região de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) nas estações seca, transição e chuva.....	41
Figura 20. Análise do valor de OTUs observados dentro de cada amostra de solo coletado em região de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0 cm) e cupinzeiro profundo (60cm) para as estações da seca, transição e chuva.....	41
Figura 21. Ilustração do metabolismo do solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação da seca a partir da análise de inferência funcional.....	44

Figura Suplementar 1. Abundância relativa dos grupos bacterianos na estação chuvosa e a transição em relação às amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm).....57

Figura Suplementar 2. Valor do índice de Shannon para diversidade bacteriana das amostras de solo coletados no IBGE em Brasília para as estações seca, chuvosa e a transição em 2017 e 2018.....57

Figura Suplementar 3. Valor do número de Pielou para equitabilidade bacteriana das amostras de solo de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em Brasília para as estações seca, chuvosa e a transição em 2017 e 2018.....58

Figura Suplementar 4. Análise de coordenada principal (PCoA) dos dados de inferência funcional das amostras de solo para as estações seca, chuvosa e a transição.....58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relatório do número de sequências para cada amostra. 26
- Tabela 2.** Tabela dos parâmetros químicos do solo em relação as diferentes estações para as amostras de campo sujo (60cm) e cupinzeiro (0 e 60cm) medidos em laboratório a partir do solo coletado no IBGE em 2017 e 2018 32
- Tabela Suplementar 1.** Análise estatística dos filos bacterianos na estação seca para as amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm). 56
- Tabela Suplementar 2.** Valores de correlação das variáveis nitrato, umidade, amônio e pH com os eixos do gráfico de análise de componente principal (PCA). 56
- Tabela Suplementar 3.** Números EC obtidos a partir da análise de inferência funcional das amostras do campo sujo e cupinzeiro relacionados ao metabolismo de N na estação seca. 57
- Tabela Suplementar 4.** Números EC obtidos a partir da análise de inferência funcional que são significativamente diferentes entre as amostras do campo sujo e cupinzeiro relacionados ao metabolismo de N nas estações seca, chuvosa e a transição. 57

LISTA DE SIGLAS

OTU : Operational Taxonomic Unit (Unidade Taxonômica Operacional)

cm : centímetros

C60: Cupinzeiro profundidade 60 cm

C0: Cupinzeiro superfície 0 cm

CS: Campo Sujo

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS	12
SUMÁRIO	13
1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 O Cerrado e sua termitosfera	15
1.2 A colônia de cupins e o gênero <i>Syntermes</i>	17
1.3 A microbiota do solo e os ciclos biogeoquímicos	19
2.0 HIPÓTESES	21
3.0 OBJETIVO	22
4.0 METODOLOGIA	23
5.0 RESULTADOS	27
6.0 DISCUSSÃO	42
7.0 CONCLUSÃO	48
8.0 REFERÊNCIAS	49
9.0 APÊNDICE	56
10. ANEXOS	60

1 1.0 INTRODUÇÃO

3 1.1 O cerrado e sua termitosfera

5 O cerrado é considerado a savana tropical mais rica do mundo, com 44% da sua flora
6 endêmica e estima-se que 23% dos cupins do neotrópico se localizam neste bioma (KLINK &
7 MACHADO, 2005). Esse bioma representa cerca de 24% do território do brasileiro,
8 caracterizando o segundo bioma mais influente após a floresta Amazônica, (MARQUES *et al.*,
9 2004; SOURCE, 2009). São classificados como Latossolos (Ou Oxisols na classificação Norte-
10 Americana) por conta da acidez, coloração avermelhada, pobreza em nutrientes, baixa
11 capacidade de troca de cátions (CTC), textura argilosa e alta saturação por alumínio, o qual
12 muitas plantas acumulam em suas folhas como um atributo de resistência (SCALON *et al.*,
13 2013; SOURCE, 2009; TESTONI *et al.*, 2017). O bioma se caracteriza por invernos secos e
14 verões chuvosos, quando a precipitação anual é em torno de 1.500 mm e ocorre, praticamente,
15 entre os meses de Outubro até Março (ARAUJO *et al.*, 2012). A função biológica do solo e
16 atividade microbiana são afetadas pela mudança de estação da seca para chuvosa, o que indica
17 a importância da disponibilidade de água para os processos do solo (MENDES *et al.*, 2012;
18 SILVA, 2004).

19 A flora do cerrado possui características de uma vegetação adaptada ao fogo, com
20 árvores contorcidas de tronco firme e resistente. O fogo é um fator de importância ecológica no
21 cerrado para redistribuição e ciclagem de nutrientes acumulados nas camadas de serrapilheira
22 e matéria orgânica (MIRANDA *et al.*, 2003). Uma característica marcante da vegetação do
23 cerrado é que muitas plantas florescem ou produzem folhas novas na época da seca, uma
24 indicação de que o estresse hídrico não é tão severo para a vegetação local (POLLARD, 2009).
25 A vegetação do cerrado é subdividida de acordo com a cobertura vegetal, compreendendo três
26 tipos de formações vegetais básicas: formações florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO *et*
27 *al.*, 1998). A microbiota presente no solo varia entre os tipos de vegetação do cerrado em função
28 das diferenças abióticas, como fertilidade, umidade, pH e temperatura, sendo normalmente mais
29 rico em fisionomias de alta cobertura vegetal (ARAUJO *et al.*, 2018). O campo sujo é registrado
30 como uma fisionomia campestre e é exclusivamente herbáceo-arbustivo, com baixa cobertura
31 vegetal (RIBEIRO e WALTER, 1998).

32 O cerrado possui uma fauna de cupins diversa com pelo menos 42 espécies conhecidas
33 (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e 140 espécies registradas (CONSTANTINO *et al.*, 2005). A fauna

34 de cupins do cerrado é distinta daquela encontrada em florestas úmidas, com uma larga
35 proporção de espécies que se alimentam de serapilheira e material orgânico na superfície,
36 incluindo os grupos: *Syntermes*, *Velocitermes*, *Ruptitermes*, *Rhynchotermes*, *Cornitermes* e
37 *Nasutitermes* (CONSTATINO *et al.*, 2007). Os cupins do gênero *Syntermes* (Figura 1-d)
38 normalmente constroem cupinzeiros pequenos com a maior parte subterrânea (pode chegar a
39 1,5m) e podem ser encontrados no campo sujo (Figura 01-c) (NEGRET e REDFORD, 1982).
40 As colônias de cupins são distribuídas de acordo com a suas preferências de habitat, como
41 abundância de madeira e matéria orgânica, umidade e tipo de solo (CONSTANTINO *et al.*,
42 2007). A construção do ninho pode variar desde cupinzeiros complexos até galerias
43 subterrâneas, cuja atividade permite que partículas de solo sejam transportadas por uma
44 profundidade significativa, contribuindo para a sua aeração (SANDS, 1972). As paredes do
45 cupinzeiro são diferentes do restante da construção, pois elas têm papel crucial na estabilidade
46 do ninho durante períodos de chuva. A estruturação externa é feita de poros de diferentes
47 tamanhos, de forma que os poros maiores recebam a água e a repassem para poros menores.
48 Assim, os poros maiores ficam disponíveis para troca de gás e ventilação do ninho enquanto
49 poros menores drenam água da chuva (SINGH *et al.*, 2019).

50 A relação entre cupins e o solo é um assunto amplamente estudado (LEE e WOOD,
51 1971), mas pouco se sabe a respeito da interação entre espécies específicas de cupins e
52 diferentes tipos de solo (CONSTANTINO *et al.*, 2005). A porção do solo e do ecossistema que
53 sofre o impacto dos cupins é chamado de termitosfera, que possui características como a textura
54 do solo e conteúdo de matéria orgânica distintos do que quando comparado ao solo adjacente
55 (LAVELLE, 2018). A ação dos cupins no solo do cerrado pode estar relacionada ao aumento
56 do valor de o pH, da concentração de cálcio, de fósforo, de potássio e a diminuição da saturação
57 por alumínio (FAGERIA e BALIGAR, 2005). Muitos cupins usam as propriedades termais do
58 seu cupinzeiro para auxiliar no controle de temperatura. Em áreas quentes e secas, isso significa
59 cultivar o solo como um ambiente termalmente tamponado (TURNER *et al.*, 2008). Mudanças
60 nos parâmetros físicos e químicos do solo do cupinzeiro são fundamentais para o
61 estabelecimento da comunidade microbiana local (ARAUJO *et al.*, 2012).

62



63

64 **Figura 1. Fitofisionomia campo sujo em área de cerrado e local de coleta das amostras de solo no IBGE em**
 65 **2017 e 2018.** Vegetação associada ao cupinzeiro da espécie *S. wheeleri* identificada como *Davilla elíptica* da
 66 família Dileniaceae (a) e *Chresta sphaerocephala* da família Asteraceae (b). O cupinzeiro da espécie *S. wheeleri*
 67 indicado pela seta vermelha (b), a vegetação do campo Sujo na época da chuva (c) e o cupim trabalhador da espécie
 68 *Syntermes wheeleri* no solo de cupinzeiro (d).

69

70 1.2 A colônia de cupins e o gênero *Syntermes*

71

72 Os cupins, ou térmitas, são animais da ordem Isoptera considerados “baratas sociais”
 73 por serem ancestralmente comuns à estas e por serem animais eusociais, característica que
 74 permite a distribuição de tarefas pelo sistema de castas polimórficas, ou seja, o estágio adulto
 75 destes animais é caracterizado por mais de uma morfologia, no qual apenas uma possui o
 76 sistema reprodutor (BIGNELL e ROISIN, 2013). Dessa forma, os genes das castas estéreis são
 77 suficientemente semelhantes aos genes dos reprodutores para garantir que os trabalhadores da
 78 próxima geração continuem assistindo às castas reprodutoras, ao invés de investirem em suas
 79 próprias gônadas para serem um animal completo (HIGASHI *et al.*, 2000). Podemos então,
 80 visualizar a colônia como um único organismo que é dividido de acordo com as suas funções:
 81 Reprodução (alados, reis e rainhas); alimentação e estrutura (trabalhadores); defesa (soldados)
 82 e proteção, fortificação e homeostase (cupinzeiro) (BIGNELL *et al.*, 2011).

83 A rainha é o único indivíduo da colônia capaz de gerar descendentes após o
 84 acasalamento e, ao atingir um certo nível de maturação, os alados são gerados para deixarem o
 85 ninho a procura de um par e gerar uma nova colônia, o que ocorre geralmente durante o período
 86 de chuva (BIGNELL e ROISIN, 2013). Os trabalhadores, no entanto, raramente deixam a
 87 colônia, apenas para forragear. Eles também são responsáveis pela construção do cupinzeiro,
 88 que é fortemente defendido por soldados, e pela alimentação dos demais indivíduos do ninho,
 89 o que reflete em uma composição similar da microbiota intestinal entre os integrantes da colônia
 90 (MOREIRA *et al.*, 2018). A construção de um ninho é uma característica própria de animais
 91 eusociais, que, no caso dos cupins, serve para proteção contra predadores; evitar correntes de
 92 ar, o que reduz a perda de água e mantém a homeostase (BIGNELL, 2005).

93 O hábito alimentar não é a única variável capaz de afetar a microbiota bacteriana dos
94 cupins (SANTANA *et al.*, 2015). No entanto, as categorias nutricionais dos cupins definem a
95 sua mandíbula e possuem influencia direta na composição microbiana intestinal, sendo estas:
96 solo, matéria orgânica e madeira; que podem ser consumidas em diferentes níveis de
97 decomposição (BIGNELL, 2005; COLEMAN, 2015). Ancestralmente, os insetos costumavam
98 ser mais ativos no solo como decompositores, antes do desenvolvimento do herbivorismo, por
99 meio de associações simbióticas (COLEMAN, 2015). A estabilidade do ninho e outros
100 elementos chave da comunidade de cupins como tamanho da colônia, desenvolvimento de
101 castas e construção de um cupinzeiro estão associados à nutrição destes animais, sendo esta
102 uma característica fundamental para o desenvolvimento da eusocialidade e, portanto, para o seu
103 sucesso evolutivo (TRANIELLO & LEUTHOLD, 2000).

104 O intestino dos cupins é dividido em três partes: anterior, médio e posterior. A digestão
105 é feita, de maneira geral, via enzimas no intestino médio e fermentação no intestino posterior
106 por meio de simbioses microbianas, que são, em sua maior parte, arqueias e bactérias
107 (BIGNELL, 2005; BIGNELL e ROISIN, 2013). Alguns cupins mais desenvolvidos também
108 cultivam fungos basidiomicetos externamente em seu cupinzeiro (COLEMAN, 2015) e alguns
109 mais primitivos, contam com a presença de protistas flagelados em sua porção final do intestino
110 para auxiliar na digestão do material celulósico (BIGNELL e ROISIN, 2013). Esses
111 microrganismos são capazes de exercer diversas funções como: metabolismo dissimilatório de
112 carboidrato, consumo de oxigênio, metabolismo assimilatório e dissimilatório de nitrogênio,
113 metanogênese (ROULAND-LEFÈVRE e BIGNELL, 2006), pedogênese (BIGNELL, 2005) e
114 agirem como um sistema de defesa contra agentes externos (DILLON e DILLON, 2003). O
115 maior evento evolutivo dos cupins foi a utilização do solo para construção do seu ninho e
116 também o seu consumo, o que coincidiu com a perda de protistas e subsequente substituição
117 por simbiontes bacterianos (BIGNELL *et al.*, 2008).

118 A família Termitidae é a maior família de cupins na região tropical e agrega diversas
119 espécies de cupins endêmicas do cerrado (CONSTANTINO, 2005). O trato digestivo da família
120 Termitidae é altamente estruturado e compartimentalizado por gradientes distintos de pH, O² e
121 H², de maneira que, o alimento seja degradado por diferentes nichos da microbiota e por
122 diferentes vias metabólicas, dependendo da sua posição no trato gastro-intestinal (BRAUMAN,
123 2000; SANTANA *et al.*, 2015). O gênero *Syntermes* inclui os cupins da subfamília
124 Nasutitermitinae, família Termitidae, que são amplamente distribuídos nas savanas tropicais e
125 caracterizados pelo seu grande tamanho, ninhos normalmente subterrâneos e alimentação de

126 folhas de serrapilheira (MICHEL e BATISTA, 2013). Esses animais fazem parte do clado de
127 cupins superiores que utilizam apenas bactérias como simbiontes intestinais.

128 A perda de flagelados acelerou evoluções fisiológicas e anatômicas no intestino, com
129 um desenvolvimento e compartimentalização do intestino posterior, a fim de sofisticar os
130 sistemas de fermentação dessa região (BIGNELL e ROISIN, 2013). Os filos bacterianos mais
131 abundantes nestes cupins são: Firmicutes, Spirochaetes, Bacteroidetes e Synergistetes,
132 (SANTANA *et al.*, 2015) que estão distribuídos de acordo com as suas preferências no intestino
133 e mantidos em seus determinados compartimentos mesmo após movimentos peristálticos, o que
134 é explicado devido a presença de genes para quimiotaxia (WARNECKE *et al.*, 2007). Estudos
135 comparativos entre a microbiota intestinal e o solo do cupinzeiro dos cupins do gênero
136 *Syntermes* demonstram que ambos são diferentes entre si, com uma prevalência maior de
137 Actinobacteria e Proteobacteria no cupinzeiro e Firmicutes e Spirochaetes no intestino
138 (MOREIRA *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2015).

139

140 **1.3 A microbiota do solo e os ciclos biogeoquímicos**

141

142 A matriz do solo é construída por vários agregados de diferentes tamanhos e formas,
143 formando poros e microambientes importantes para distribuição e especialização de nichos da
144 comunidade microbiana, (YOUNG e CRAWFORD, 2004) cuja atividade varia com a
145 profundidade e é mais dependente das características intrínsecas do solo a medida que se afasta
146 da superfície (MENDES *et al.*, 2012). Pesquisadores tem demonstrado contínuo interesse na
147 enorme diversidade microbiana encontrada em ambientes terrestres, responsável por governar
148 produtividade vegetal e manter ciclos biogeoquímicos importantes. Aproximadamente, 80%
149 dos processos que ocorrem no solo são mediados pela microbiota (NANNIPIERI *et al.*, 2003).

150 O ciclo do carbono compreende da interação entre a fotossíntese terrestre e marinha,
151 respiração e formação de matéria orgânica, dependente de dois gases principais: CO₂ e metano,
152 que fazem parte do efeito estufa e regulam a temperatura da Terra. A microbiota do solo
153 consome parte dessa biomassa primária de carbono na forma de decomposição e auxilia na
154 formação e manutenção da matéria orgânica do solo (HORWATH, 2007). Desde o final dos
155 anos 1800s, o uso de combustível fóssil, desmatamento e conversão de áreas para pasto e
156 agricultura, resultaram em uma transferência do carbono para a atmosfera (FALKOWSKI *et*
157 *al.*, 2008), que possui um efeito direto nas mudanças climáticas.

158 O nitrogênio é um elemento essencial para a vida e assume diversas formas são
159 altamente dependentes da atividade de microrganismos do solo (HORWATH, 2007). A

160 transformação de N₂ para a forma orgânica do nitrogênio permite a entrada deste elemento no
161 ciclo biológico (PIRES, 2016), que consiste em três processos: decomposição da matéria
162 orgânica e degradação do N orgânico em amônia ou fixação de N₂ atmosférico via
163 microrganismos do solo, assimilação do N orgânico em nitrito e processos dissimilatórios
164 (PAJARES e BOHANNAN, 2016). A fixação biológica de N₂ por microrganismos é a maior
165 fonte de nitrogênio na natureza (GALLOWAY *et al.*, 2003). O ciclo do fósforo (P) está
166 interligado ao ciclo do N, uma vez que a mobilização desse elemento é dada pela enzima
167 fosfatase no processo de mineralização, cuja síntese requer grande quantidade de N (PAJARES
168 e BOHANNAN, 2016). A vegetação do cerrado é mais limitante em fósforo (P) do que
169 nitrogênio (N), mas a limitação de nitrogênio ainda é maior do que em outros ecossistemas
170 como florestas chuvosas tropicais (NARDOTO *et al.*, 2006). Assim como nos demais ciclos, o
171 ciclo do fósforo é afetado por diversos fatores do solo como: umidade, pH, composição da
172 matéria orgânica e concentração de O₂ (ESPINOZA *et al.*, 1914).

173 A comunidade microbiana do solo é altamente numerosa e diversa e geralmente tem que
174 lidar com baixa abundância de recursos e condições não favoráveis que reduzem a taxa de
175 crescimento e metabolismo dos microorganismos (HORWATH, 2007). A atividade microbiana
176 no solo está menos associada à vegetação, sazonalidade e ano quando este é coletado entre 5 a
177 20 cm do que na superfície do solo, 0 a 5 cm. Com o aumento da profundidade, a comunidade
178 microbiana fica mais dependente das características intrínsecas do solo (MENDES *et al.*, 2012).
179 Em relação à microbiota do solo do cerrado, o impacto do fogo é menor do que a sazonalidade,
180 não havendo diferenças significativas na biomassa microbiana logo após a queimada (SILVA,
181 2004), indicando o quão importante é a sazonalidade para este ambiente.

182 O estudo de filos dominantes em determinados ambientes permite compreender a
183 capacidade funcional de uma comunidade microbiana. Apesar da relação entre a diversidade
184 bacteriana e os diferentes parâmetros do solo ser ainda pouco conhecida (BAVEYE *et al.*,
185 2018), alguns filos representam um grupo "core" de dominantes que são relativamente
186 invariáveis e presentes em abundâncias proporcionais entre amostras de solo (DELGADO-
187 BAQUERIZO *et al.*, 2018). Uma análise anterior mostra que os filos mais abundantes do solo
188 de cerrado são: Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia,
189 Planctomycetes, Gemmatimonadetes e Bacteroidetes, (ARAUJO *et al.*, 2012; DE CASTRO *et*
190 *al.*, 2016), o que enquadra a comunidade do solo do cerrado como semelhante à comunidade
191 de outros solos, uma vez que Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria são os filos mais
192 abundantemente distribuídos (DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2018; JANSSEN, 2006), o que
193 indica que esses filos são componentes importantes os processos de função microbiana no solo.

194 2.0 HIPÓTESES

195

196

1. *O solo do cupinzeiro terá menor diversidade bacteriana do que o solo do cerrado;*

197

198

- a. Os cupinzeiros são feitos a partir das próprias fezes dos cupins ou solo cimentados com saliva, ou uma combinação dos dois (CONSTANTINO *et al.*, 2006). A saliva dos cupins normalmente possui peptídeos antimicrobianos e antifúngicos que auxiliam na defesa contra patógenos da colônia e podem afetar diretamente a microbiota do solo do cupinzeiro (HAMILTON e BUMMER, 2011). As suas fezes, por sua vez, possuem uma composição microbiana distinta daquela do solo, que é específica para processos digestórios e intestinais e são geralmente anaeróbicas e alcalinofílicas (SANTANA *et al.*, 2015; BRUNE e DIETRICH, 2015).

199

200

201

202

203

204

205

206

207

2.0. *O conteúdo de nitrogênio e pH do solo de cupinzeiro é maior do que do solo do cerrado;*

208

209

210

- a. As atividades dos cupins no ecossistema alteram o conteúdo de carbono orgânico, umidade e o pH do solo (LEE e WOOD, 1971), que é normalmente mais alcalino em regiões de cupinzeiro em relação ao solo adjacente (LI *et al.*, 2017). Apesar do conteúdo de nitrogênio nas fezes dos cupins resultante da sua fixação de nitrogênio pelos seus simbiontes intestinais ser baixa, ela pode ainda ser fonte de nitrogênio sob determinadas condições (BREZNAK, 1982).

211

212

213

214

215

216

217

3. *A sazonalidade não altera a riqueza bacteriana do solo do cupinzeiro;*

218

219

- a. O cupinzeiro possui papel protetor para a colônia, mantendo condições de temperatura e umidade favoráveis aos cupins (SINGH *et al.*, 2019; TURNER *et al.*, 2008) e permite o armazenamento de reservas de alimento, uma vantagem especialmente em regiões que ocasionalmente ocorrem queimadas, inundações ou condições ambientais diversas que impeçam o forrageamento (BIGNELL e ROISIN, 2013). Desta forma, o cupinzeiro se mantém estável a ações externas como a mudança de estações e do fogo no cerrado brasileiro.

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229 3.0 OBJETIVO

230

231 3.1 Objetivo geral

232

233 O objetivo desse trabalho de mestrado é caracterizar a comunidade bacteriana do solo
234 do cupinzeiro, espécie *Syntermes wheeleri*, e comparar com a microbiota do solo do cerrado,
235 Campo sujo.

236

237 3.2 Objetivos específicos

238

239 a) Caracterizar a comunidade bacteriana das amostras de solo de campo sujo(50-60cm) e
240 cupinzeiro (0-10cm e 50-60cm);

241 b) Avaliar o impacto da sazonalidade sob parâmetros de diversidade entre as amostras;

242 c) Analisar e comparar parâmetros do solo associados ao conteúdo de nitrogênio e pH;

243 d) Comparar índices de diversidade e riqueza entre os sítios das amostras e entre as
244 estações propriedades químicas do solo de cupinzeiro e de cerrado campo sujo;

245 e) Analisar o efeito da sazonalidade sob a estrutura da comunidade microbiana do solo de
246 cupinzeiro.

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261 4.0 METODOLOGIA

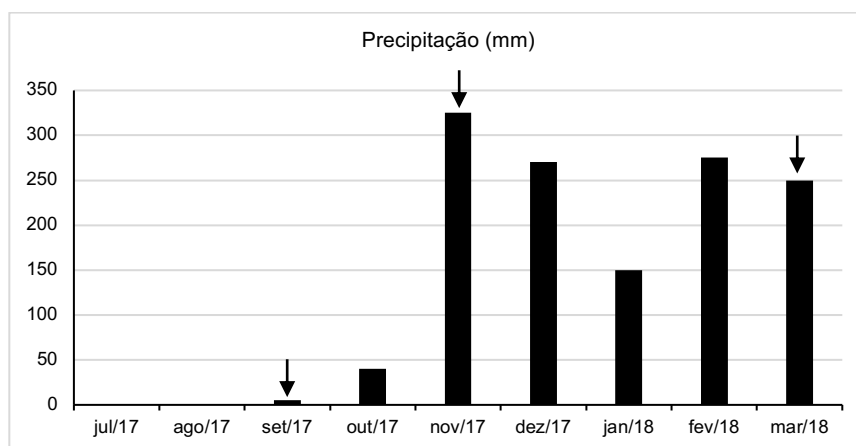
262

263 4.1 Coleta e amostragem do solo

264

265 A fim de caracterizar as propriedades do solo do cupinzeiro e do cerrado, a coleta foi
 266 feita em triplicatas na fitofisionomia identificada como Campo Sujo no IBGE (15°56'54.6"S ;
 267 47°52'11.7"W) do solo de cupinzeiro da espécie *S. wheeleri*, identificado por meio da
 268 observação do soldado da espécie e coletada em dois níveis de profundidade diferentes com um
 269 intervalo de 10cm, no topo (0-10 cm) e entre 50-60 cm de profundidade, enquanto o solo do
 270 campo sujo foi coletado a 100 metros de distância do cupinzeiro na mesma profundidade entre
 271 50-60 cm para controle. As amostras foram coletadas em diferentes períodos para avaliar o
 272 efeito da sazonalidade, o período da seca foi em setembro de 2017, a da transição em novembro
 273 do mesmo ano, e a da chuva em março de 2018 (figura 03). As amostras foram peneiradas no
 274 local e armazenadas em sacos plásticos herméticos e levadas em caixas térmicas com gelo até
 275 o laboratório para armazenamento a -80°C no mesmo dia.

276



277

278 **Figura 2. Dados da precipitação mensal de julho de 2017 à Março de 2018 em Brasília disponibilizados pelo**
 279 **Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).** As setas indicam os meses em que foram coletados as amostras de
 280 solo: estação seca em setembro de 2017, transição em novembro de 2017 e estação chuvosa em março de 2018.

281

282 4.2 Parâmetros físicos e químicos

283 Para analisar a composição química do solo, o pH em água foi medido em laboratório a
 284 partir de 10g de solo em 25mL de água destilada e medido com o potenciômetro pH HANNA
 285 HI 2221 Calibration Check pH/ORP meter calibrado, após 1 hora de repouso da solução. A
 286 mineralização líquida de nitrogênio foi feita com 2 gramas de solo armazenado e 25 mL de KCl
 287 1M. Após 1 hora de agitação contínua, foram filtrados 10 mL do sobrenadante em tubos

288 identificados. A determinação do nitrato e do amônio foram feitas pelo espectrofotômetro
289 Shimadzu UV-1203 para medições em 218, 228, 254, 280 nm para o nitrito e com reagente de
290 Nessler para o amônio. Para o cálculo de umidade do solo, parte da amostra coletada foi
291 disposta em pequenos recipientes de alumínio que foram pesados e colocados destampados
292 durante 72 horas a 105°C em uma estufa para secar e foram pesados novamente. Em ambas
293 pesagens, desconsiderando o peso do recipiente, foi feito o cálculo para umidade gravimétrica
294 (CLAESSEN e BARRETO, 1996).

295

296 **4.3 Extração de DNA genômico**

297

298 O solo armazenado no freezer -80° foi parcialmente descongelado para extração de DNA
299 de acordo com a metodologia do protocolo de Griffiths, et al 2000 com 0,5g de solo em um
300 tubo com “beads” de vidro, utilizando CTAB 5%, clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e
301 precipitando o material genético com 30% PEG 6000 durante 12 horas. O DNA foi quantificado
302 pelo método Qubit BR e a qualidade do material foi verificada com gel de agarose.

303

304 **4.4 Biblioteca do gene rRNA 16S e sequenciamento**

305

306 Para descrição da comunidade bacteriana do solo, as 27 amostras de DNA foram
307 enviadas para sequenciamento na Macrogen, Coréia do Sul. A empresa foi responsável pela
308 construção da biblioteca de 16S marcando para a região V3-V4 do gene com *primers* padrão
309 (Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC).
310 O sequenciamento do amplicon rRNA 16S foi feito na plataforma Illumina Miseq, “pair-
311 ended”, 300 pares de base, 100k *reads*/amostra e entregue em formato fastq. A qualidade do
312 sequenciamento foi analisada pelo programa FASTQC versão 0.11.8, Andrews S (2010).
313 FASTQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at:
314 <http://www.bioinformatics.brabraham.ac.uk/projects/fastqc>.

315

316 **4.5 Análise de Bioinformática e estatística**

317

318 As sequências brutas foram pré-processadas pelo programa bbduk no pacote do
319 BBTools para remoção de adaptadores Nextera e sequências Phix (BBMap – Bushnell B.
320 – sourceforge.net/projects/bbmap/). As sequências foram então importadas para o programa

321 QIIME2 2019.7 (BOLYEN *et al.*, 2019) e o pipeline executado como sequências “paired-
 322 ended”. Para caracterização bacteriana com base na taxonomia, foram utilizados os *plug-ins*
 323 disponíveis do programa (<https://docs.qiime2.org/2019.10/plugins/>) para unir os pares de
 324 sequências, retirar os primers (MARTIN, 2011), filtrar por qualidade (mínimo 20)
 325 (BOKULICH *et al.*, 2013), dereplicar, clusterização de OTUs utilizando o método de novo
 326 VSEARCH com 97% de identidade, remoção de chimeras (UCHIME de novo) (ROGNES *et*
 327 *al.*, 2016) e taxonomia utilizando o banco de dados SILVA (2018) (QUAST *et al.*, 2012).

328 Para comparação da comunidade bacteriana entre os solos, foi feita a análise a partir de
 329 gráficos de “Principal Component Analysis” (PCoA), curva de rarefação, número de OTUs
 330 observadas e índices de Pielou e Shannon através do programa QIIME2 (BOLYEN *et al.*,
 331 2019). A análise de inferência funcional também foi avaliada por meio do pipeline do
 332 PICRUST2 (LANGILLE *et al.*, 2013) adaptado para ser utilizado dentro QIIME2 como um
 333 *plug in*. As análises estatísticas foram feitas para validar os dados entre as amostras e avaliar o
 334 impacto da sazonalidade. Testes de normalidade (Shapiro), paramétricos (t e anova) e não
 335 paramétricos (Kruskall-Wallis) foram feitos pelo programa Prism versão 8.0.2 e pelo programa
 336 Rstudio versão 1.1.456 – © 2009-2018 RStudio, Inc. Gráficos de NMDS, RDA e heatmap
 337 foram feitos por pipelines no Rstudio, com os pacotes: Vegan (OKSANEN *et al.*, 2019),
 338 Phyloseq (MCMURDIE e HOLMES, 2013) e Pheatmap (KOLDE *et al.*, 2019),
 339 respectivamente.

340

341 **Tabela 1. Relatório do número de sequências das amostras de solo do campo sujo e cupinzeiro na estação**
 342 **seca, chuvosa e a transição.** Amostras estão dispostas em triplicatas de acordo com a sua estação coletada, de
 343 maneira que: CS representam amostras do solo do campo sujo, C0 representam amostras do solo do topo do
 344 cupinzeiro (0-10 cm) e C60 representam as amostras do solo do cupinzeiro profundo (50-60 cm). O número de
 345 sequências para cada amostra está representado pelo ‘nº de reads’.

Amostra	Estação	nº de reads
CS 1	Seca	292.964
CS 1	Transição	316.672
CS 1	Chuva	313.396
CS 2	Seca	325.076
CS 2	Transição	290.122
CS 2	Chuva	348.036
CS 3	Seca	316.966
CS 3	Transição	321.988
CS 3	Chuva	346.532
C0 1	Seca	349.610
C0 1	Transição	320.894
C0 1	Chuva	303.686

C0 2	Seca	291.644
C0 2	Transição	352.714
C0 2	Chuva	337.440
C0 3	Seca	325.634
C0 3	Transição	321.140
C0 3	Chuva	351.796
C60 1	Seca	318.624
C60 1	Transição	338.964
C60 1	Chuva	302.450
C60 2	Seca	328.794
C60 2	Transição	303.334
C60 2	Chuva	305.224
C60 3	Seca	315.918
C60 3	Transição	320.978
C60 3	Chuva	325.526

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367 5.0 RESULTADOS

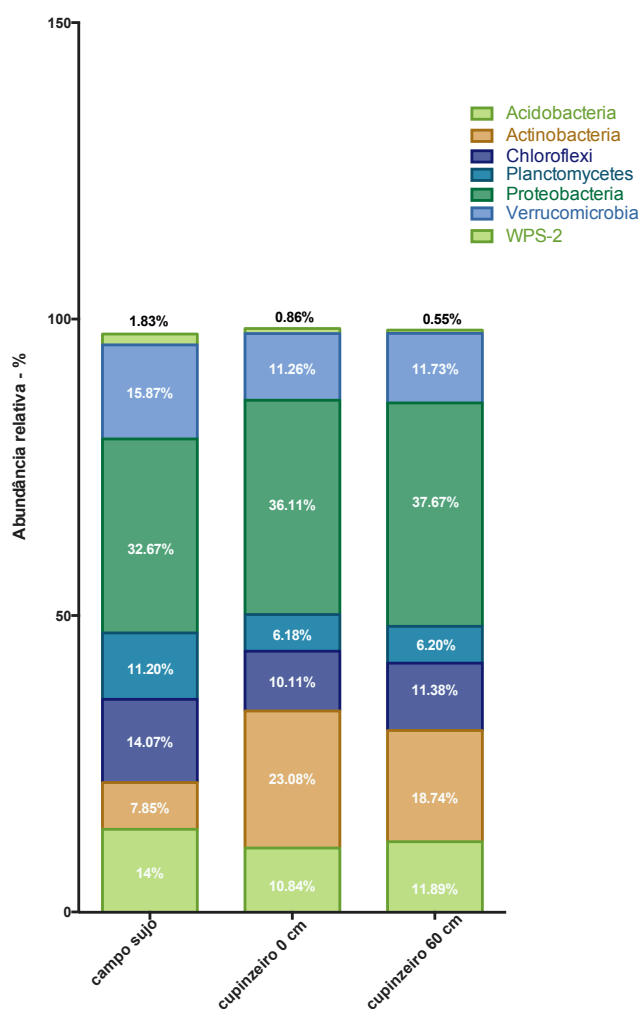
368

369 5.1 O solo do cupinzeiro será menos diverso do que o solo do cerrado em relação aos 370 grupos bacterianos.

371

372 Os filos mais abundantes nas amostras de solo foram: Acidobacteria, Actinobacteria,
373 Chloroflexi, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia e WPS-2 (Figura 3 e Figura S1).
374 A análise estatística (tabela suplementar S1) mostrou que Actinobacteria e Proteobacteria eram
375 significativamente mais abundantes nas amostras do cupinzeiro do que nas amostras do campo
376 sujo. Os filos raros foram considerados como aqueles que representam menos de 1% da
377 comunidade bacteriana total e compreendem cerca de 2% da comunidade total do campo sujo
378 e cerca de 1,5% da comunidade dos cupinzeiros (Figura 4).

379

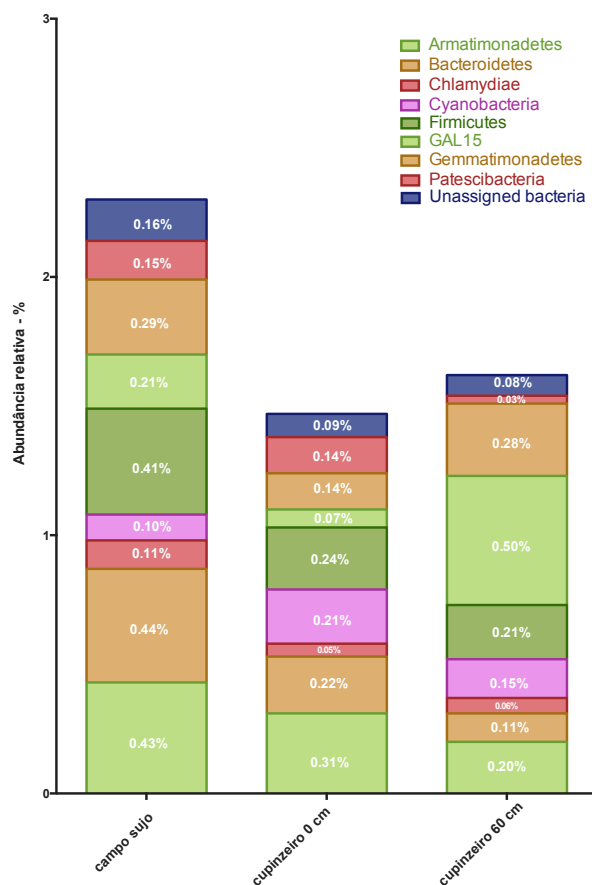


380

381 **Figura 3. Abundância relativa dos filos bacterianos abundantes para as amostras de campo sujo (60cm),**
382 **cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60 cm) na estação seca de 2017. Filos cuja abundância relativa**

383 representa mais de 1% da comunidade bacteriana total estão dispostos no gráfico com a sua respectiva percentagem
 384 descrita em branco (ou preto para WPS-2). Os valores são médias aritméticas das triplicatas de campo sujo,
 385 cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca.

386



387

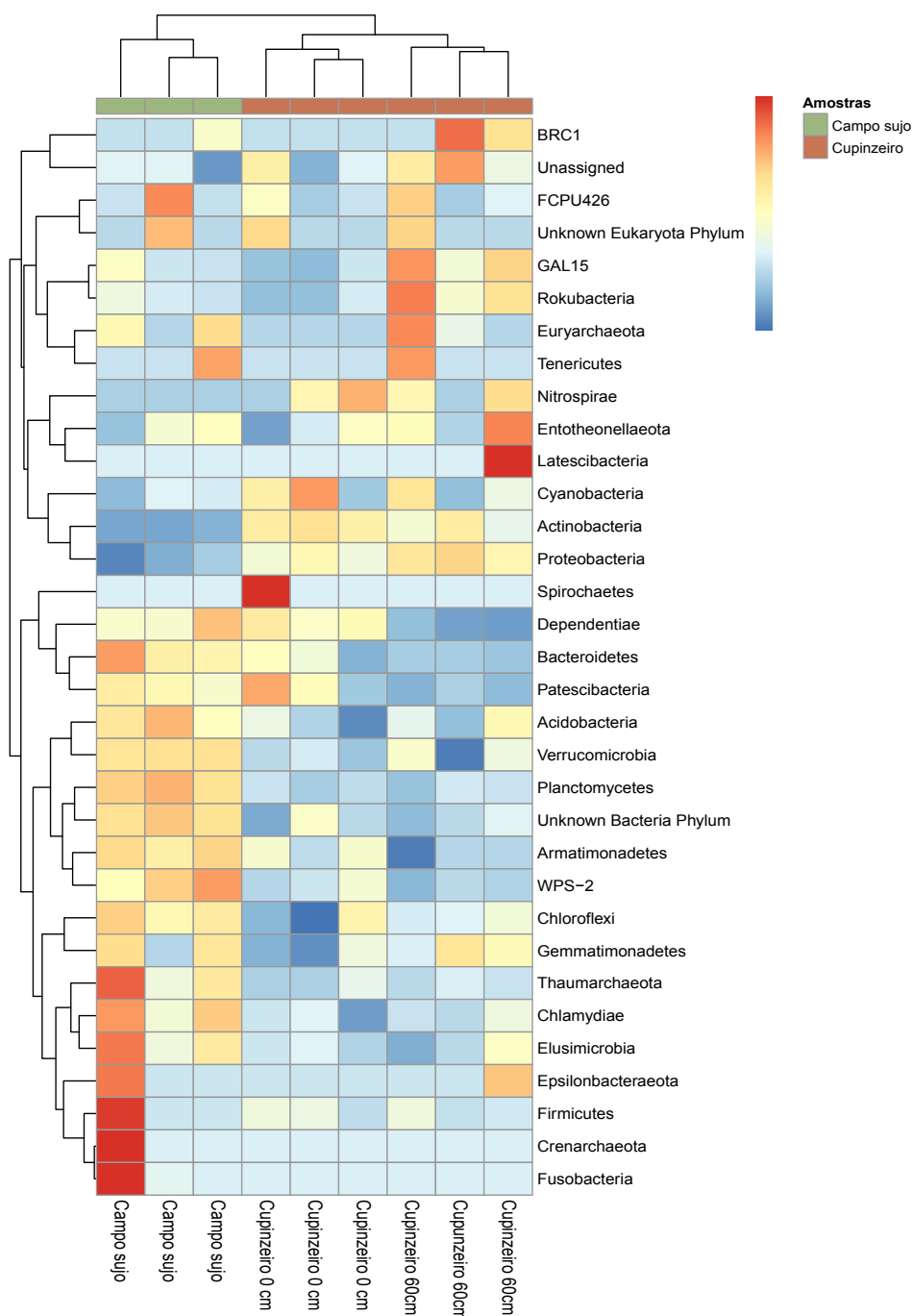
388 **Figura 4. Abundância relativa dos filamentos bacterianos raros de 1% para as amostras de campo sujo (60cm),**
 389 **cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca de 2017.** Filos cuja abundância relativa
 390 representa menos de 1% da comunidade bacteriana total estão dispostos no gráfico com a sua respectiva
 391 percentagem descrita em branco. Os valores são médias aritméticas das triplicatas de campo sujo, cupinzeiro topo
 392 (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca.

393

394 Para confirmar essa diferença entre os solos, foi feito um *heatmap* com o número de
 395 sequências dos filamentos na estação seca (Figura 5). As triplicatas do solo controle se agrupam
 396 filogeneticamente quanto à sua similaridade pela distribuição dos filamentos microbianos da mesma
 397 forma que as amostras do cupinzeiro. Dentro do clado dos cupinzeiros, existe uma subdivisão
 398 para as amostras do topo (0-10cm) e do solo profundo (50-60cm), demonstrando que elas
 399 também diferem entre si quanto à distribuição dos filamentos.

400

401



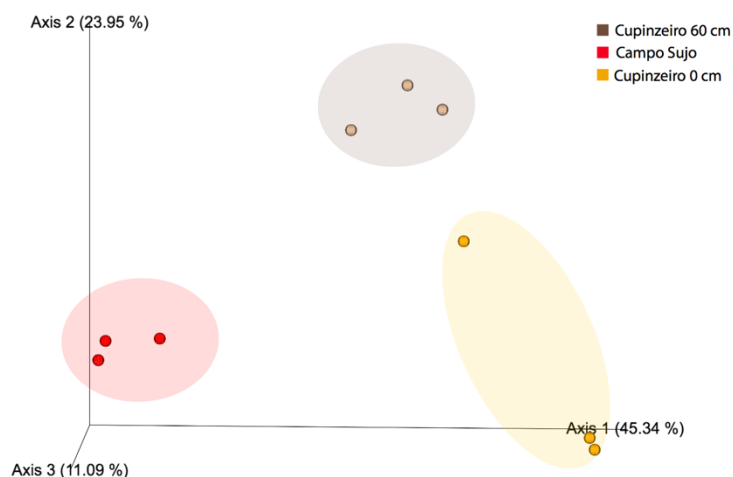
402

403 **Figura 5. Análise de ‘heatmap’ da disposição dos filios bacterianos de acordo com a sua abundância relativa**
 404 **para amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca**
 405 **de 2017.** As triplicatas das amostras do campo sujo, cupinzeiro 0 cm e cupinzeiro 60 cm estão dispostas
 406 horizontalmente de acordo com a sua similaridade na parte inferior do gráfico. Os filios bacterianos estão dispostos
 407 verticalmente de forma que os tons quentes (vermelho, laranja e amarelo) representam maior abundância daquele
 408 filo na amostra em comparação às demais. Os tons frios em azul representam menor abundância do filo na amostra.

409

410 O gráfico de PCoA analisa as amostras pela matriz de dissimilaridade Bray Curtis que
 411 as separa de acordo com a sua composição microbiana (Figura 6), indicando uma separação

412 entre o campo sujo e o cupinzeiro (Axis 1 – 45,34%) e uma uma separação entre as duas
 413 profundidades do cupinzeiro (Axis 2 – 23,95%) quanto à sua composição taxonômica.
 414



415

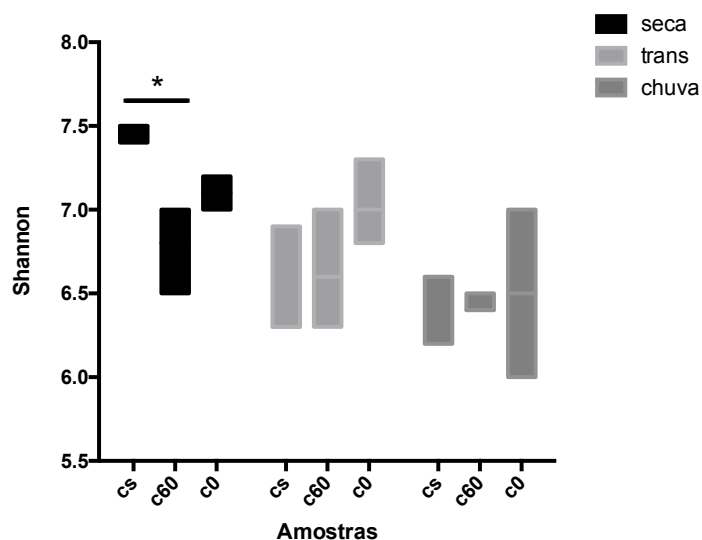
416 **Figura 6. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do**
 417 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação seca de 2017.**
 418 Coordenadas principais da análise de Bray Curtis separam as amostras do campo sujo em vermelho, cupinzeiro
 419 topo (0cm) em laranja e cupinzeiro profundo (60cm) em marrom (Axis 1 – 45,34% e Axis 2 – 23,95% e Axis 3 –
 420 11,09%).

421

422 A diversidade das amostras e das estações foi medida pelo índice de shannon. Na estação
 423 seca é onde encontra-se o maior índice de shannon na amostra do solo de campo sujo (50-60cm)
 424 que é significativamente maior que o índice de shannon do cupinzeiro profundo (50-60cm),
 425 indicando que o solo do cupinzeiro é menos diverso que o solo do campo sujo na seca. Para a
 426 estação chuvosa e a transição, não há diferença estatística entre o valor do índice de Shannon
 427 para as amostras (Figura 7 e Figura S2).

428

429



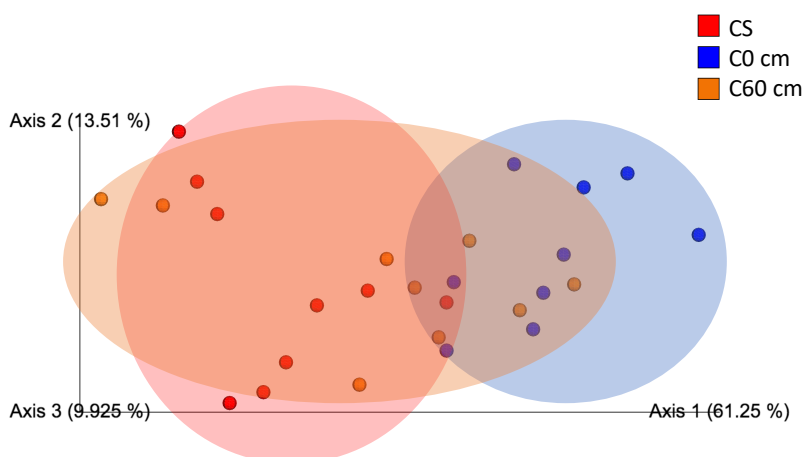
430

431 **Figura 7. Valor do índice de Shannon para diversidade bacteriana das amostras de solo de campo sujo**
 432 **(60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm), coletados no IBGE em Brasília, 2017 e 2018.**
 433 As amostras estão dispostas no eixo x do gráfico e os valores do índice de Shannon no eixo y. As estação seca,
 434 chuvosa e a transição estão representadas pela escala de cor cinza e preto de acordo com a legenda. Valores
 435 significativos foram considerados com o valor de $p < 0,05$ e estão indicados com '*'.

436

437 Apesar da diferença entre as amostras, a análise de predição funcional permite inferir, a
 438 partir de uma análise dissimilatória, a influência do sítio de coleta ou estação no funcionamento
 439 de processos da comunidade microbiana. A predição genômica é feita para cada amostra e o
 440 *output* tem a relação completa da soma das vias funcionais que pode ser usado em uma análise
 441 dissimilatória. A análise de inferência funcional da comunidade microbiana das amostras do
 442 campo sujo e do cupinzeiro (Figura 8) e das estações (Figura S3) mostra uma aglomeração no
 443 centro do gráfico de dissimilaridade, indicando provável redundância funcional.

444



445

446 **Figura 8. Análise de coordenada principal (PCoA) dos dados de inferência funcional das amostras de solo**
 447 **do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm).** Coordenadas principais da

448 análise de Bray Curtis separam as amostras do campo sujo em vermelho, cupinzeiro topo (0cm) em azul e
449 cupinzeiro profundo (60cm) em laranja (Axis 1 – 61,25%; Axis 2 – 13,51% e Axis 3 – 9,925%).

450

451 A análise funcional a partir da taxonomia permitiu a anotação de enzimas que participam
452 do metabolismo do nitrogênio. Desta forma, as amostras de solo do campo sujo e do cupinzeiro
453 são potencialmente capazes de: executar a fixação de nitrogênio, pela enzima nitrogenase;
454 reduzir nitrato a nitrito, pela enzima nitrato redutase; reduzir óxido nítrico, pela enzima óxido
455 nítrico redutase; produzir precursores do metabolismo do glicérol, pela enzima glicérol-3-
456 fosfato desidrogenase; oxidar amônia em nitrito, pela enzima amônia monoxigenase; produzir
457 glutamina a partir de amônia e glutamato, pela enzima glutamina sintetase e produzir glutamato
458 pela enzima glutamato sintase (Apêndice 1 – tabela suplementar 3). A enzima glutamina
459 sintetase (GS) é mais abundante nas amostras da transição e chuva do campo sujo e cupinzeiro
460 topo (0-10cm) enquanto que, para as amostras do cupinzeiro profundo (50-60cm), ela é mais
461 abundante na estação seca. A glutamato sintase, por sua vez, é mais abundante na estação seca
462 para amostras de solo do campo sujo (50-60cm) e cupinzeiro topo (0-10cm) (Apêndice 1 –
463 tabela suplementar 4).

464

465 ***5.2 O conteúdo de nitrogênio e pH do solo de cupinzeiro é maior do que do solo do cerrado.***

466

467 Os valores de nitrito, amônio, umidade e pH foram medidos em laboratório e estão
468 dispostos na Tabela 2. Nitrito e amônio foram os parâmetros usados para representar o conteúdo
469 de nitrogênio das amostras. A análise estatística para dados não paramétricos foi aplicada a
470 todos os parâmetros. A sazonalidade não foi estatisticamente diferente para as análises do
471 nitrato, amônio e pH. Portanto, a estatística aplicada para esses parâmetros em relação aos
472 grupos de campo sujo, cupinzeiro topo (0-10cm) e cupinzeiro profundo (50-60cm) foi feita
473 desconsiderando as estações.

474

475

476

477

478

479

480

481

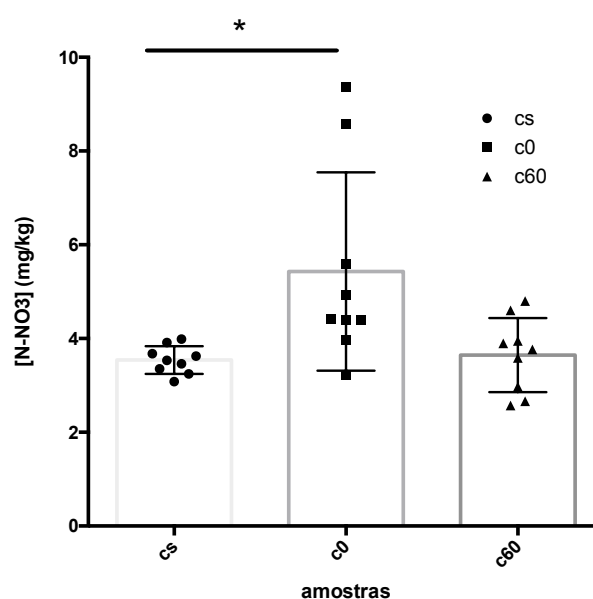
482 **Tabela 2. Tabela dos parâmetros químicos do solo em relação as diferentes estações para as amostras de**
 483 **campo sujo (60cm) e cupinzeiro (0 e 60cm) medidos em laboratório a partir do solo coletado no IBGE em**
 484 **2017 e 2018.** Os valores estão dispostos consistem na média aritmética das triplicatas de campo sujo ou cupinzeiro
 485 em uma determinada estação. Os valores de desvio padrão para cada parâmetro está representado por 'DP'.

Estação	amostra	Profundidade	[N-NO ₃] (mg/kg)	DP	[N-NH ₄] (mg/ kg)	DP	umidade (%)	DP	pH	DP
Seca	campo sujo	50-60 cm	3,59	0,34	3,18	1,12	17	1,8	4,9	0,3
	cupinzeiro topo	0-10 cm	4,26	0,25	4,15	1,63	12	0,1	5,2	0,02
	cupinzeiro profundo	50-60 cm	3,99	1,23	4,51	0,74	16	0,3	5,3	0,06
Transição	campo sujo	50-60 cm	3,5	0,17	4,13	0,24	19	2,1	5,4	0,14
	cupinzeiro topo	0-10 cm	6,36	1,9	5,08	1,66	20	6	5,4	0,08
	cupinzeiro profundo	50-60 cm	3,48	0,47	3,95	1,36	18	2,82	5,8	0,04
Chuva	campo sujo	50-60 cm	3,54	0,42	4,95	1,84	26	1,37	5,7	0,02
	cupinzeiro topo	0-10 cm	5,66	3,23	5,05	1,58	23	0,94	4,7	0,45
	cupinzeiro profundo	50-60 cm	3,46	0,7	4,31	0,87	25	1,86	5,6	0,02

486

487 Os dados de nitrato para as amostras de solo coletadas no topo do cupinzeiro (0-10cm)
 488 foram estatisticamente maiores do que em relação às amostras de solo coletadas no campo sujo
 489 (50-60cm) ($p = 0,01$) (Figura 9). Os dados de amônio entre as amostras de solo coletadas no
 490 campo sujo ambas profundidades do cupinzeiro não foram estatisticamente diferentes entre si
 491 (Figura 10) e os dados de pH foram estatisticamente maiores para as amostras de solo coletadas
 492 no cupinzeiro profundo (50-60cm) do que em relação às amostras de solo coletadas no topo (0-
 493 10cm) (Figura 11).

494

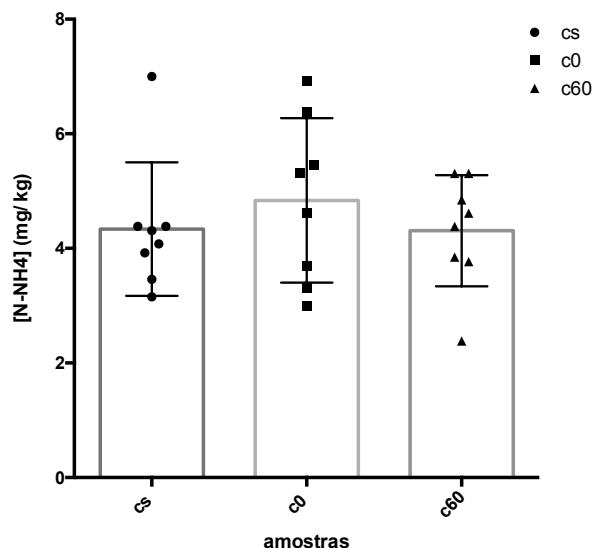


495

496 **Figura 9. Análise dos dados de nitrato [N-NO₃] das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo**
 497 **(0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018.** As amostras de campo sujo e

498 cupinzeiro estão representados no eixo x como cs (campo sujo), c0 (cupinzeiro topo) e c60 (cupinzeiro profundo).
 499 Os dados estatisticamente significativos não-paramétricos Kruskal-Wallis estão representados entre cs e c0 por
 500 ‘**’, valor de $p < 0,05$.

501

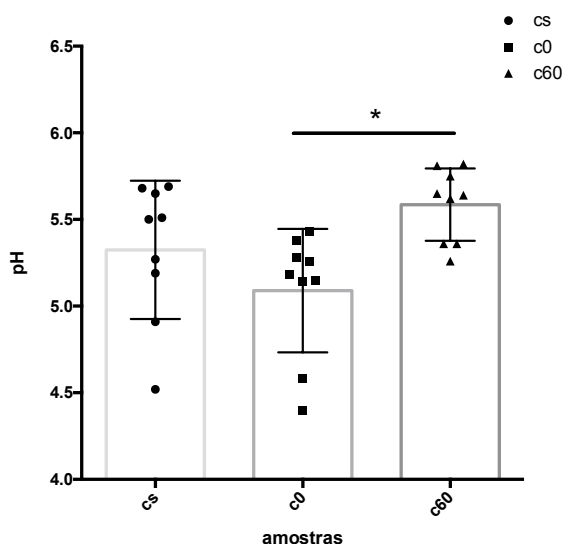


502

503 **Figura 10.** Análise dos dados de amônio [N-NH4] das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro
 504 topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018. As amostras de campo sujo e
 505 cupinzeiro estão representados no eixo x como cs (campo sujo), c0 (cupinzeiro topo) e c60 (cupinzeiro profundo).
 506 Os dados estatisticamente significativos não-paramétricos Kruskal-Wallis estão representados por ‘**’, valor de p
 507 $< 0,05$.

508

509



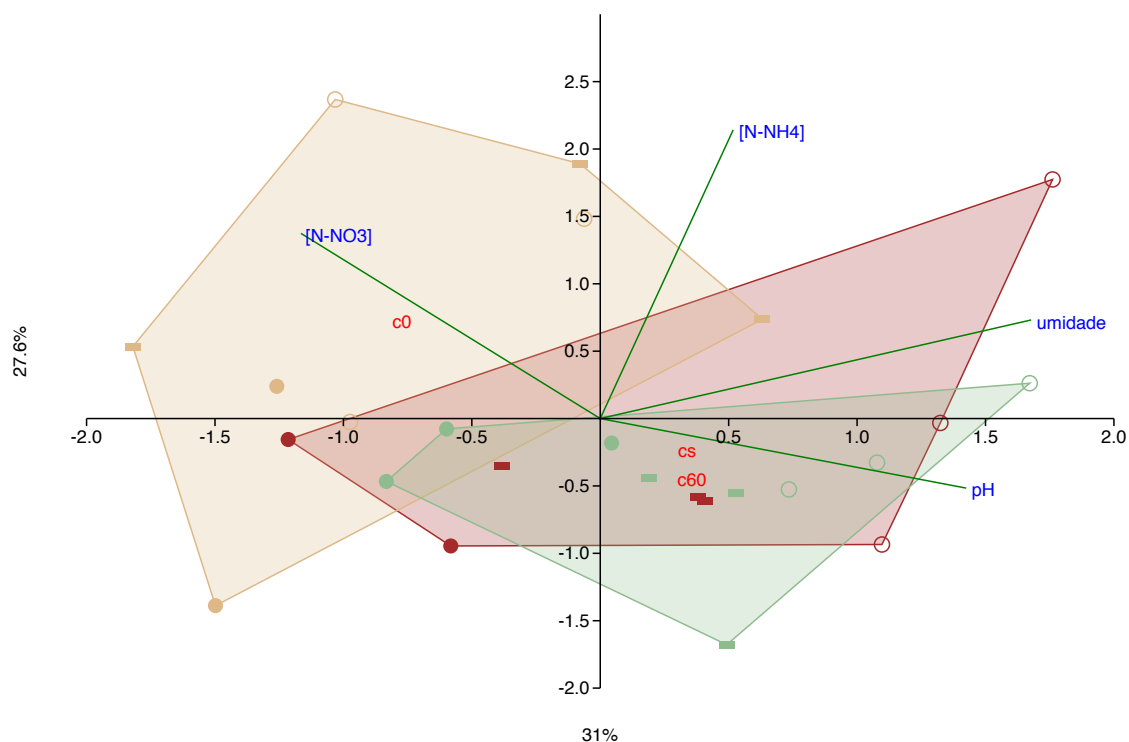
510

511 **Figura 11.** Análise dos dados de pH das amostras de solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e
 512 cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em 2017 e 2018. As amostras de campo sujo e cupinzeiro estão
 513 representados no eixo x como cs (campo sujo), c0 (cupinzeiro topo) e c60 (cupinzeiro profundo). Os dados
 514 estatisticamente significativos não-paramétricos Kruskal-Wallis estão representados entre c0 e c60 por ‘*’, valor
 515 de $p < 0,05$.

516

517 Os valores de nitrato superiores no cupinzeiro topo (0-10cm) tendem a separar essa
 518 amostra dos demais solos pela análise de componente principal (PCA) (Figura 12). Os valores
 519 de correlação de cada variável com os eixos do gráfico estão dispostos no material suplementar
 520 (Tabela S2).

521 ● seca
 ○ chuva
 — transição



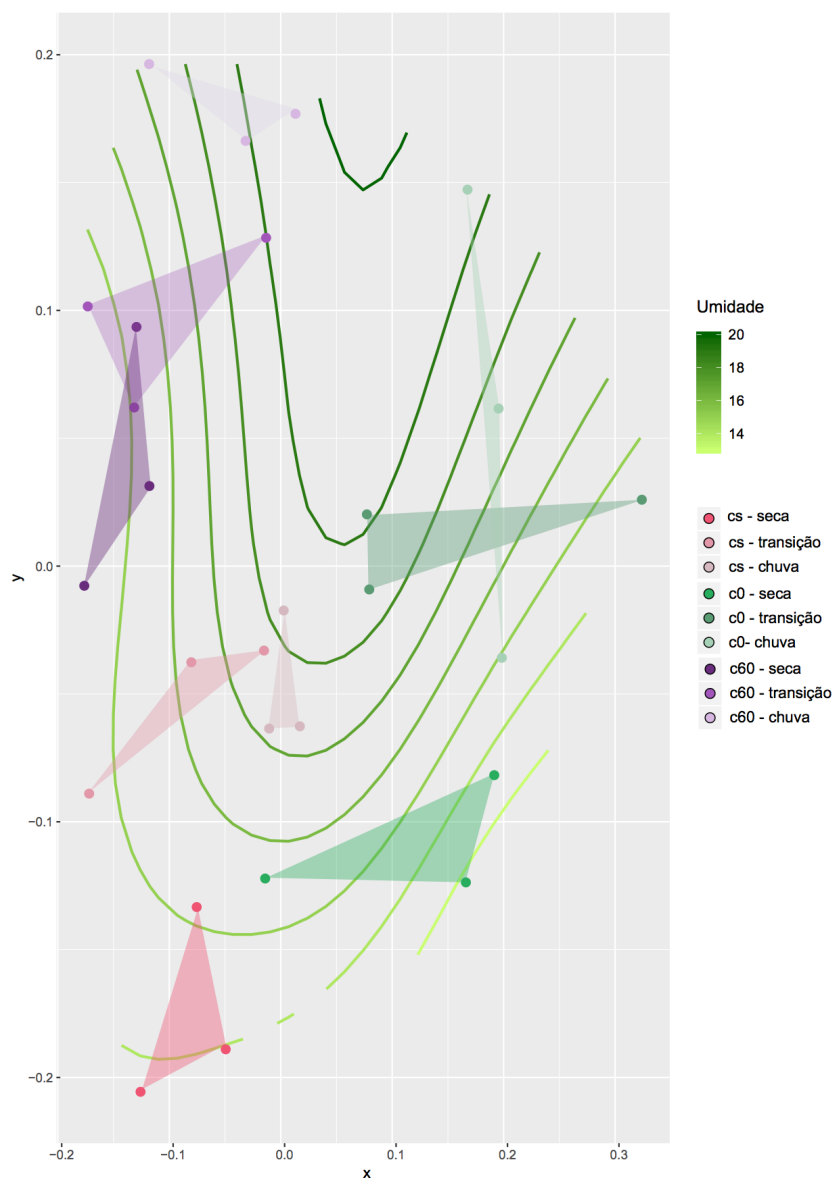
522

523 **Figura 12. Análise de componente principal dos parâmetros das amostras de solo e campo sujo (60cm),**
 524 **cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE, Brasília em 2017 e 2018.** Os valores
 525 de nitrato, amônio, umidade e pH são aqueles dispostos na tabela 2 para cada amostra de solo, que são separadas
 526 pelos eixos 1 (35,49%) e eixo 2 (24,60%). As amostras de cupinzeiro topo (0-10cm) estão representadas como c0,
 527 as amostras de cupinzeiro profundo (50-60cm) como c60 e as amostras de campo sujo (50-60cm) como cs. As
 528 formas indicam as triplicatas de cada estação; a bola cheia representa a seca, a bola vazia representa a chuva e o
 529 traço representa a transição.

530

531 A influência da sazonalidade sob a comunidade bacteriana das amostras de solo do
 532 campo sujo e cupinzeiro foi analisada através do gráfico de escalonamento multidimensional
 533 não-métrico (NMDS), em que os valores de umidade foram pré-fixados e a comunidade
 534 bacteriana foi disposta de acordo com a sua dissimilaridade (Figura 12). As amostras mais
 535 úmidas são aquelas coletadas no cupinzeiro profundo (50-60cm) durante a chuva, associando
 536 os grupos bacterianos dessa amostra a essa variável. O filo Verrucomicrobia foi o único que se
 537 relacionou positivamente de maneira significativa com a umidade ($R^2=0,68$) (Figura 13).

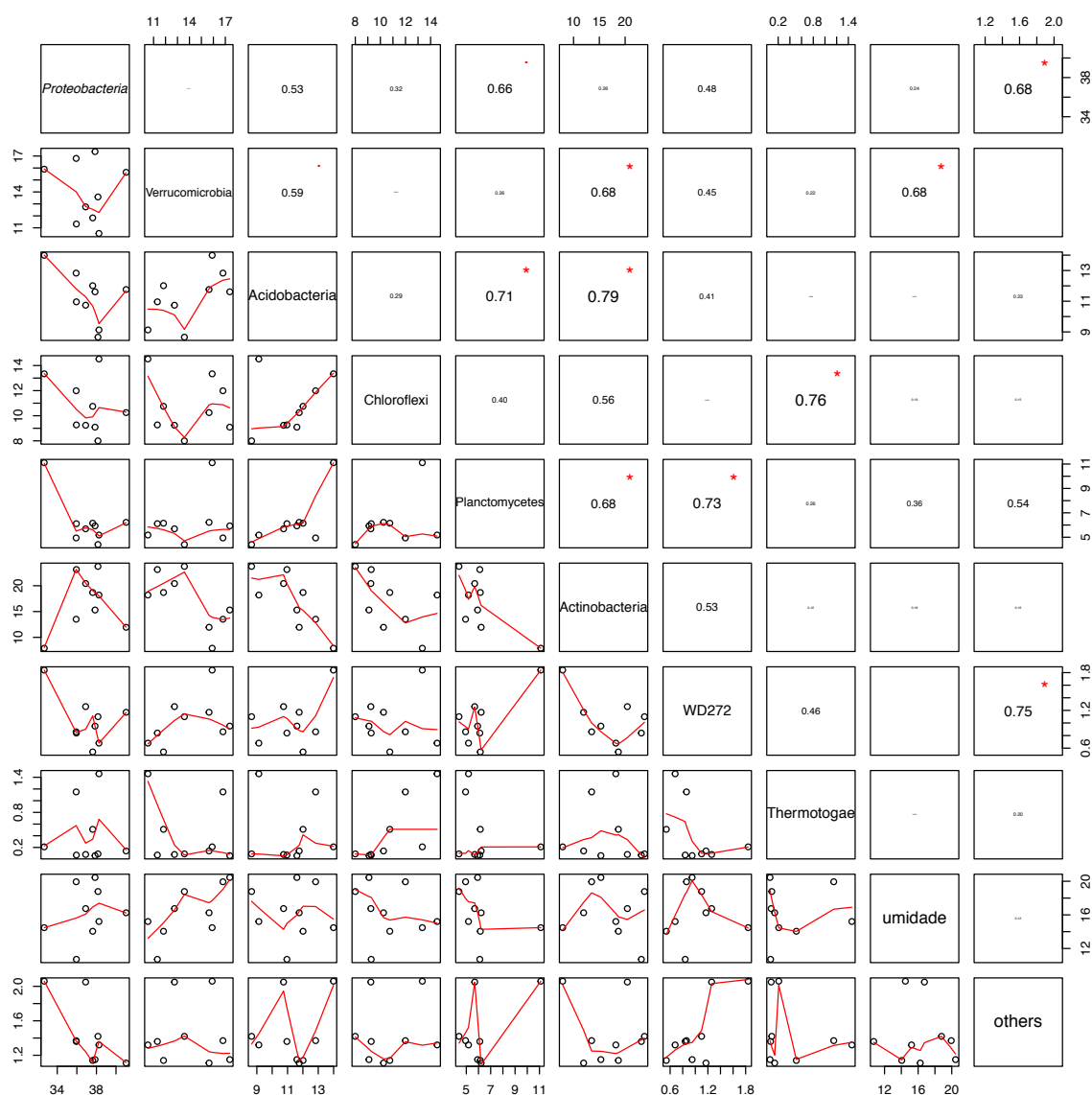
538



539

540 **Figura 13. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da comunidade bacteriana das amostras**
 541 **de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) em relação à umidade medida**
 542 **das estações seca, transição e chuva em 2017 e 2018.** Dados da matriz de OTUs bacterianas foram distribuídos
 543 de acordo com a análise dissimilaridade Bray Curtis e dispostas de acordo com os seus valores de umidade. As
 544 amostras de campo sujo estão representadas pela cor vermelha com a sigla “cs” em triplicatas, enquanto amostras
 545 do cupinzeiro topo (0cm) estão representadas pela cor verde e pela sigla “c0” e as amostras do cupinzeiro profundo,
 546 pela cor roxa e a sigla “c60”. O gradiente de verde indica os valores da umidade do solo, de forma que o verde
 547 mais escuro são as amostras mais úmidas e o verde mais claro, amostras mais secas.

548



549

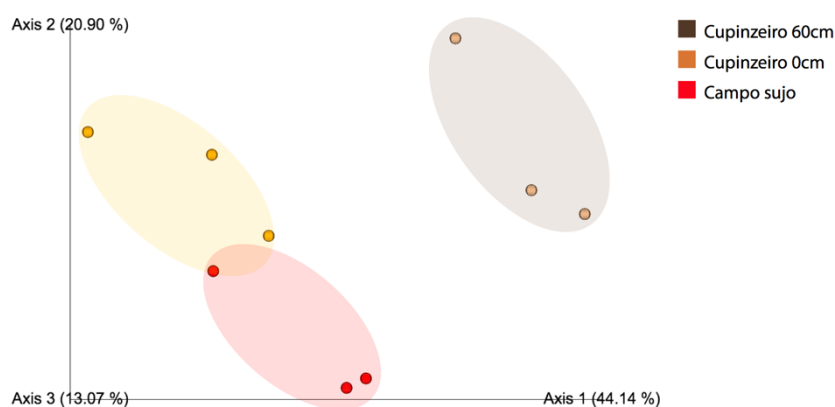
550 **Figura 14. Análise de regressão linear entre os filamentos bacterianos mais abundantes para as amostras de campo**
 551 **sujo e cupinzeiro na estação chuvosa em relação a umidade.** Os valores nos quadrantes correspondem ao valor
 552 R da regressão linear e o * vermelho são para valores significativos estatisticamente. Os gráficos representam a
 553 relação do filo com outro filo ou a variável umidade.

554

555 A influência da umidade para diversidade das amostras foi disposta em uma análise de
 556 componente principal. A transição entre as estações mostra que as amostras do campo sujo e
 557 cupinzeiro topo (0-10 cm) estão mais próximas entre si do que as amostras do cupinzeiro
 558 profundo (50-60 cm) (Figura 14), que é um padrão diferente daquele observado na estação seca
 559 (Figura 6) e chuvosa (Figura 15), em que as amostras estão mais distantes entre si.

560

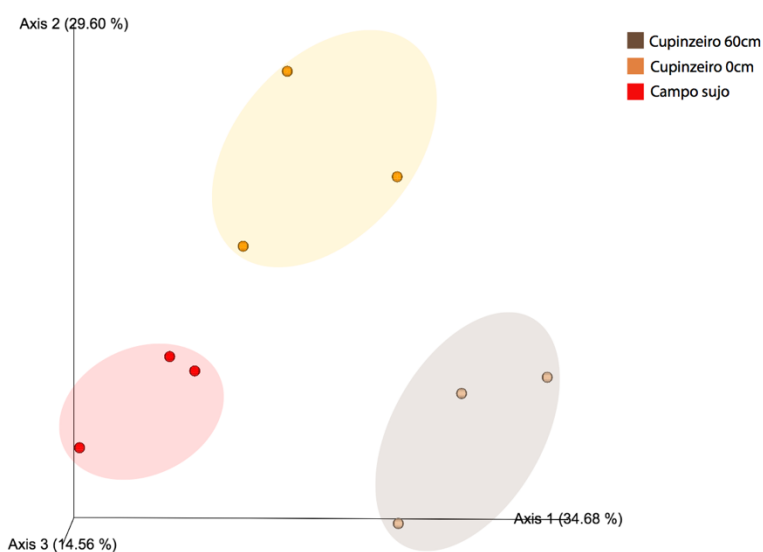
561



562

563 **Figura 15. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do**
 564 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na transição de 2017.** Coordenadas
 565 principais da análise de Bray Curtis separam as amostras do campo sujo em vermelho, cupinzeiro topo (0cm) em
 566 laranja e cupinzeiro profundo (60cm) em marrom (Axis 1 – 44,14%; Axis 2 – 20,90% e Axis 3 – 13,07%).

567



568

569 **Figura 16. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade bacteriana das amostras de solo do**
 570 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) na estação chuvosa de 2018.** Coordenadas
 571 principais da análise de Bray Curtis separam as amostras do campo sujo em vermelho, cupinzeiro
 572 topo (0cm) em laranja e cupinzeiro profundo (60cm) em marrom (Axis 1 – 34,68%; Axis 2 – 29,60% e Axis 3 –
 573 14,56%).

574

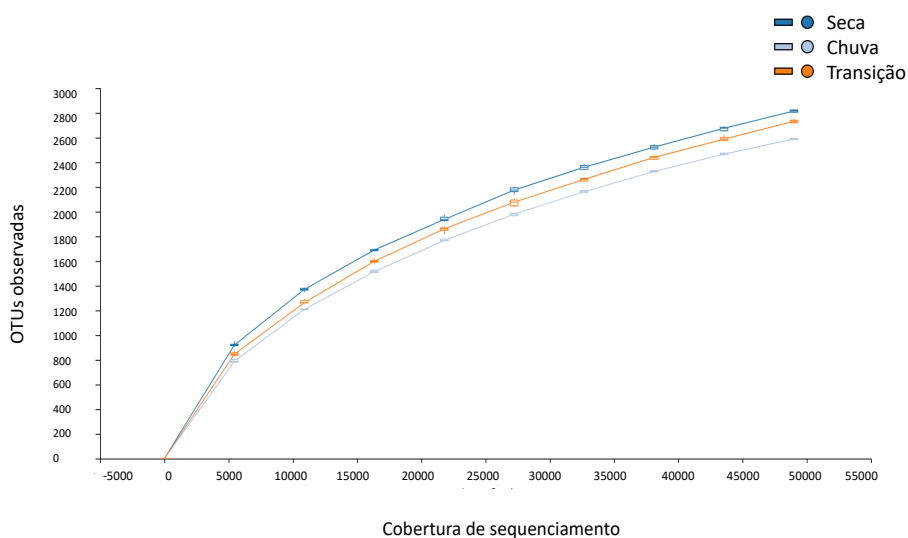
575 **5.3 A sazonalidade não altera a riqueza bacteriana do solo do cupinzeiro.**

576

577 O número de espécies detectado em uma amostra é fortemente influenciado pelo número
 578 de sequências analisadas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006). O número de OTUs das

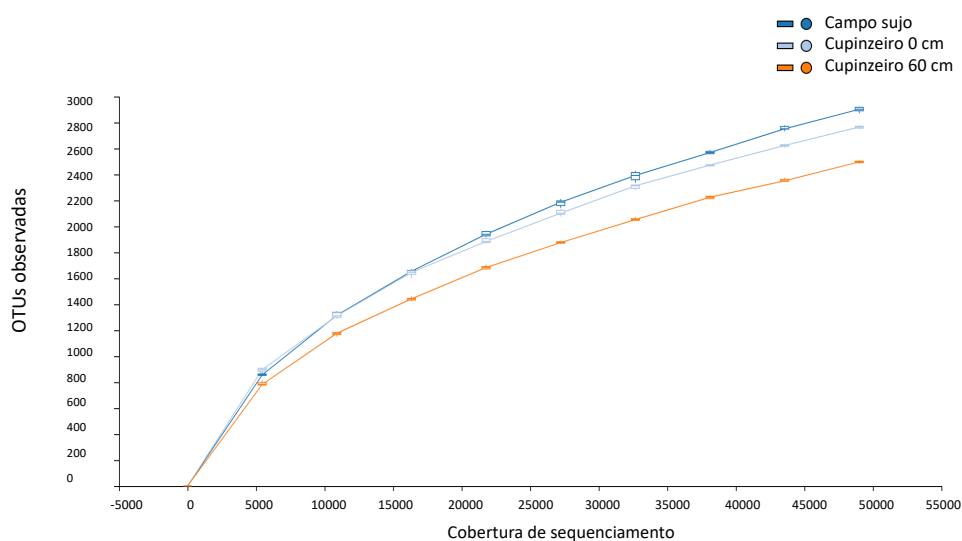
579 amostras de cupinzeiro e campo sujo aumenta de acordo com o número de sequências na curva
 580 de rarefação até atingir um máximo, o que estima uma cobertura significativa para amostragem,
 581 apesar de não atingir um platô (Figura 16 e 17).

582 O número de OTUs observados também foi utilizado para medir a riqueza microbiana
 583 das amostras e das estações. A estação seca é a que possui maior número de OTUs observados
 584 e a estação chuvosa o menor número (Figura 16). Em relação às amostras, o solo de cupinzeiro
 585 profundo (50-60cm) é a que possui menor número de OTUs observados e a amostra de solo
 586 coletado na região de campo sujo (50-60cm) possui maior número (Figura 17).
 587



588

589 **Figura 17. Curva de alpha-rarefação do número de OTUs observadas nas estações da seca, chuva e a**
 590 **transição do solo coletado em área de campo sujo (60cm), solo de cupinzeiro na superfície (0cm) e solo do**
 591 **cupinzeiro profundo (60cm) no IBGE, Brasília no ano de 2017 e 2018. Eixo y número de OTUs observadas e**
 592 **eixo x cobertura do sequenciamento para as amostras. A estação da seca está representada em azul escuro, a**
 593 **transição em laranja e a chuva em azul claro.**

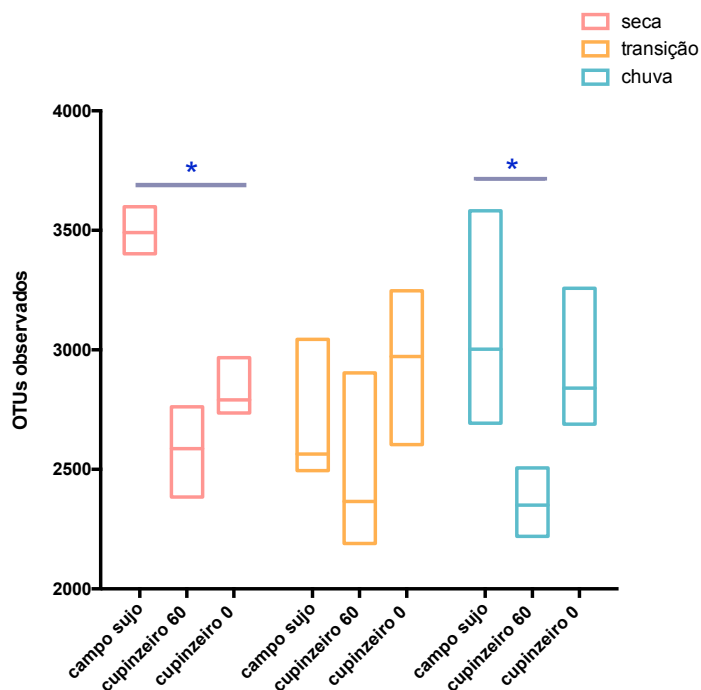


594

595 **Figura 18. Curva de alpha-rarefação do número de OTUs observadas para o solo coletado em área de campo**
 596 **sujo (60cm), solo de cupinzeiro na superfície (0cm) e solo do cupinzeiro profundo (60cm) no IBGE, Brasília**
 597 **no ano de 2017 e 2018.** Eixo y número de OTUs observadas e eixo x cobertura do sequenciamento. As amostras
 598 do solo da superfície do cupinzeiro (cupinzeiro 0 cm) está representada em azul claro, enquanto as amostras do
 599 solo de cupinzeiro profundo (cupinzeiro 60cm) está em laranja e as amostras do solo da região de campo sujo (60
 600 cm), em azul claro.

601

602 Durante a estação da seca, o número de OTUs observados no campo sujo é
 603 significativamente maior que as amostras de cupinzeiro topo (0-10cm) e profundo (50-60cm).
 604 Na estação chuvosa o número de OTUs observados no cupinzeiro profundo (50-60cm) é
 605 significativamente menor do que as amostras de solo do topo (0-10cm) e do campo sujo (Figura
 606 18). Durante a transição, o número de OTUs observados para as três amostras não é diferente
 607 estatisticamente (Figura 18). A amostra de solo do campo sujo é a única que possui diferença
 608 significativa entre o número de OTUs entre as estações, diminuindo a sua riqueza a medida que
 609 a as estações avançam. A sazonalidade não possui efeito significativo para a riqueza das
 610 amostras de solo do cupinzeiro topo (0-10cm) e cupinzeiro profundo (50-60cm) (Figura 19).
 611

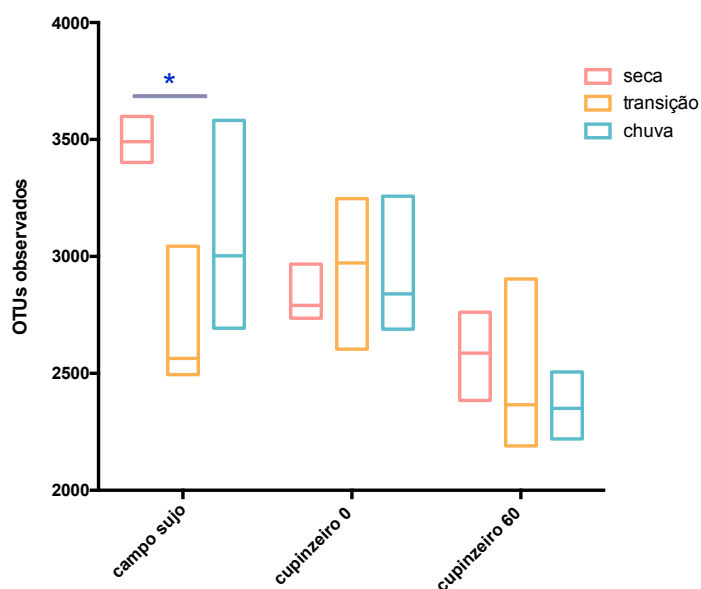


612

613 **Figura 19. Análise do valor do número de OTUs observados para as amostras de solo coletado em região de**
 614 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) nas estações seca, transição e**
 615 **chuva.** O número de OTUs observadas está representado no eixo y do gráfico enquanto as amostras estão no eixo
 616 x. A estação seca é representada pela cor vermelha, a transição pela cor laranja e a estação chuvosa pela cor azul.
 617 Valores significativos foram considerados com o valor de $p < 0,05$ e estão indicados com '*'.

618

619



620

621 **Figura 20. Análise do valor de OTUs observados dentro de cada amostra de solo coletado em região de**
 622 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0 cm) e cupinzeiro profundo (60cm) para as estações da seca, transição**
 623 **e chuva.** O número de OTUs observados está representado no eixo y enquanto as amostras estão no eixo x. A cor
 624 rosa indica a estação seca, a laranja a transição e azul a estação chuvosa. Valores significativos foram considerados
 625 com o valor de $p < 0,05$ e estão indicados com '*'.

626 A equitabilidade da comunidade microbiana foi medida a partir do índice de Pielou, que
627 é calculado pelo número total de indivíduos dividido pelo número de espécies que representa a
628 distribuição de espécies dentro de uma amostra (PIELOU, 1966). Não há diferença entre o
629 índice de Pielou das amostras do campo sujo, topo do cupinzeiro (0-10 cm) e cupinzeiro
630 profundo (50-60 cm). Em relação às estações, a amostra com maior índice de Pielou é a seca
631 (Apêndice 2 – Figura S2).

632

633 **6.0 DISCUSSÃO**

634

635 **6.1 O solo do cupinzeiro será menos diverso do que o solo do cerrado em relação aos grupos** 636 **bacterianos.**

637

638 A maior parte dos filos bacterianos do solo são raros e apenas uma pequena parte é
639 abundante. No entanto, essa “pequena” parte abundante representa cerca de 41% das sequências
640 totais do gene 16S rRNA e muitos são encontrados em uma grande variedade de solos
641 (DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2018). Os filos com maior abundância relativa nas amostras
642 de solo mostrados nesse trabalho (Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria,
643 Verrucomicrobia, Chloroflexi, Planctomycetes) podem ser encontrados como mais
644 representativos na maior parte dos solos amostrados em outros estudos (ARAUJO *et al.*, 2012;
645 DE ARAUJO *et al.*, 2018; DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2018; RAPPÉ e GIOVANNONI,
646 2003; SILVA *et al.*, 2019; HORWATH, 2007). As Actinobacteria possuem uma relação
647 simbiótica com os cupins que provêm, além da ciclagem e troca de nutrientes, proteção destes
648 contra patógenos externos através da produção de antimicrobianos, encontrados em abundância
649 nos cupinzeiros (SUJADA *et al.*, 2014). Actinobacteria é considerado o segundo filo mais
650 abundante no intestino de cupins superiores e mais prevalente naqueles que se alimentam de
651 húmus e solo (LIU *et al.*, 2019). Um estudo recente sobre a diversidade funcional da
652 comunidade bacteriana do solo de cupinzeiro revelou sequências de virulência, patogenicidade
653 e defesa predominantes nesse solo, responsáveis por uma proteção significativa do ninho
654 (ENAGBONMA *et al.*, 2019).

655 No domínio Bacteria, o filo Proteobacteria constitui atualmente o maior grupo e também
656 o mais diverso fenotipicamente. Vários representantes desse filo possuem importância
657 ecológica no ciclo do carbono, enxofre, nitrogênio e são reconhecidos por sua capacidade de
658 interagir com raízes das plantas, como as *Rhizobia* que induzem nódulos do sistema de raízes

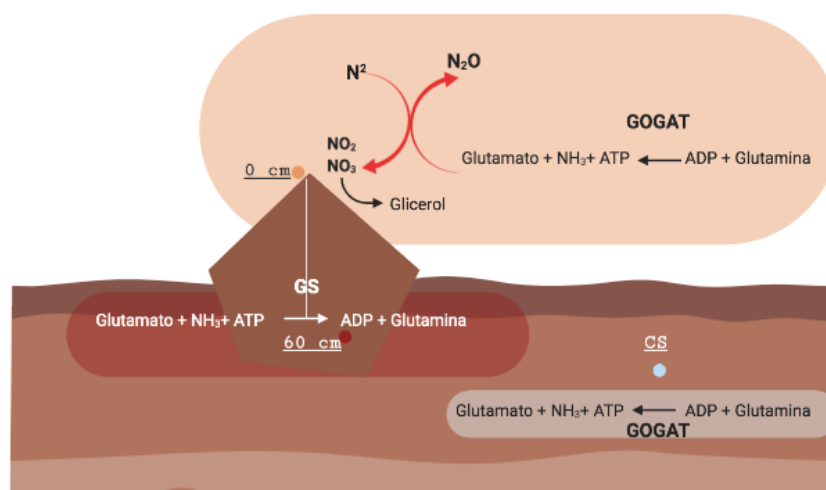
659 de leguminosas, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, criando um relação simbiótica com
660 a planta (ROBERTSON e KUENEN, 2006). A amônia é o produto primário resultado da
661 fixação de N por vias simbióticas (BROWN e DILWORTH, 1975) e também é o produto de
662 fixação primária a partir dos aminoácidos glutamato e glutamina pelas rotas das enzimas
663 glutamina sintetase e glutamato sintase (KENNEDY, 1966). A atividade dessas duas enzimas
664 é normalmente mais alta em situações em que o nitrogênio é um elemento limitante (BROWN
665 e DILWORTH, 1975).

666 Nesse trabalho, a dinâmica entre elas é trazida pela análise de inferência funcional, de
667 forma que, a enzima glutamina sintetase é, potencialmente, mais abundante nas amostras de
668 cupinzeiro profundo na estação seca enquanto que, para as demais amostras, ela é mais
669 abundante na presença da umidade, sendo responsável pela fixação de nitrogênio e produção
670 de glutamina (WOOLFOLF *et al.*, 1966), aminoácido geralmente associado ao crescimento
671 bacteriano (FILDES e GLADSTONE, 1939). Da mesma maneira, a glutamato sintetase estaria
672 mais abundantemente presente nas amostras de campo sujo e cupinzeiro topo no período da
673 seca, catalisando então a via contrária de formação de glutamato (VANONI e CURTI, 1999),
674 associado à resposta de estresse bacteriano contra ambientes ácidos (FEEHILY e KARATZAS,
675 2013) (Figura 20).

676 Um estudo comparativo da comunidade microbiana do solo em diferentes gradientes de
677 nitrogênio na forma de nitrato de amônio demonstrou que as amostras com níveis maiores de
678 adição de nitrogênio tinham maior abundância em Proteobacteria do que amostras com níveis
679 baixos de adição (FIERER *et al.*, 2012). Na maioria dos sistemas, altos níveis de nitrogênio
680 estão relacionados à produtividade vegetal, correspondendo a mudanças na composição da
681 comunidade (NARDOTO *et al.*, 2006). A possível abundância das enzimas glutamina sintetase,
682 glutamato sintase e glutamato desidrogenase nas amostras de solo do campo sujo e cupinzeiro
683 indicam o potencial metabolismo de nitrogênio associado a essas amostras.

684

685



686

687 **Figura 21. Ilustração do metabolismo do solo do campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro**
 688 **profundo (60cm) na estação da seca a partir da análise de inferência funcional.** O cupinzeiro 0 cm e 60 cm
 689 estão representados pela cor laranja (0cm) e vermelha (60 cm) e o campo sujo está representado pela cor azul e
 690 “CS”. As reações que possivelmente ocorrem em maior abundância no cupinzeiro 0 cm são: metabolismo do
 691 nitrogênio, desde a sua fixação até transformação em nitrito, nitrato e glicerol e a via e produção de glutamato pela
 692 GOGAT. A reação de formação de glutamina pela GS ocorre no cupinzeiro 60 cm e no campo sujo a reação é
 693 dirigida pela GOGAT no sentido de produção de glutamato. Figura autoral feita pelo www.biorender.com.

694

695 **6.2 O conteúdo de nitrogênio e pH do solo de cupinzeiro é maior do que do solo do cerrado**

696

697 No solo, os processos químicos e a atividade da comunidade microbiana estão
 698 intimamente conectados. No entanto, a relação entre esses ainda é pouco conhecida (BAVEYE
 699 *et al.*, 2018). A análise simultânea da comunidade microbiana e os parâmetros do solo,
 700 demonstraram que o pH é o fator mais significativo para composição, diversidade e biomassa
 701 da microbiota local, sendo capaz de moldar a disponibilidade de nutrientes do solo
 702 (ZHALNINA *et al.*, 2014). O solo é normalmente mais ácido em locais próximos a superfície
 703 e amostragens mais profundas podem, potencialmente, diluir a acidez do pH (REEVES e
 704 LIEBIG, 2016). A umidade, por sua vez, é capaz de alterar a composição química do solo do
 705 cerrado, como o pH (SILVA *et al.*, 2019). Esse mesmo estudo mostrou que Verrucomicrobia
 706 era o filo mais associado à estação chuvosa no cerrado, corroborando com os dados
 707 apresentados neste trabalho.

708

709 O filo Verrucomicrobia forma um grupo distinto dentro do domínio Bacteria,
 710 caracterizado por membros amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos e que
 711 são filogeneticamente próximos ao filo Planctomycetes (LEE *et al.*, 2009). Um estudo sobre
 712 preferências de habitat para Verrucomicrobia indicou que a abundância do filo estava
 negativamente relacionada à temperatura e que a mudança de estação era o vetor mais

713 importante para variação da comunidade dessas bactérias, diminuindo à medida que as estações
714 avançam e a temperatura aumenta (CHIANG *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). Similarmente,
715 níveis de fósforo e nitrogênio das amostras foram identificados como parâmetros geoquímicos
716 correlacionados à variação da composição da comunidade de Verrucomicrobia (CHIANG *et*
717 *al.*, 2018; ZHALNINA *et al.*, 2014).

718 A análise metagenômica do intestino do cupim *S. wheeleri* demonstrou que Firmicutes
719 e Spirochaetes representam cerca de 80% da comunidade enquanto que Proteobacteria
720 representam cerca de 2% e Actinobacteria menos de 1% (SANTANA *et al.*, 2015). As
721 características físico-químicas do hospedeiro, como gradientes de pH e oxigênio no intestino,
722 sugerem que os microorganismos não estão distribuídos randômicamente (BRUNE, 2013).
723 Desta forma, o intestino anterior (maior porção do intestino da espécie *S. wheeleri*), que possui
724 pH alcalino (entre 9 e 11) e é um nicho para bactérias alcalinofílicas pertencentes ao filo
725 Firmicutes (SANTANA *et al.*, 2015). Estudos anteriores (BRAUMAN, 2000; ENAGBONMA
726 *et al.*, 2019; FALL *et al.*, 2007; SUJADA *et al.*, 2014) e esse trabalho corroboram que o solo
727 do cupinzeiro é mais semelhante ao solo no qual ele foi construído do que com o intestino dos
728 cupins.

729

730 **6.3 A sazonalidade não altera a riqueza bacteriana do solo do cupinzeiro.**

731

732 A resiliência é a taxa na qual a composição microbiana retorna ao seu estado original
733 após ser perturbada, via crescimento ou adaptações genéticas e/ou fisiológicas (ALLISON e
734 MARTINY, 2008; CRUZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2009). Ainda que a comunidade não retorne a
735 composição original, existe também redundância funcional, em que diferentes táxons são
736 capazes de exercer um mesmo processo, na mesma medida e sob as mesmas condições
737 ambientais (ALLISON e MARTINY, 2008). A equitabilidade da comunidade se relaciona com
738 a estabilidade do ecossistema e a tolerância a perturbações, pois a probabilidade de resistência
739 da comunidade é maior do que quando essa é dominada por poucas populações (WITTEBOLLE
740 *et al.*, 2009). Desta maneira, a seca é a estação mais estável de acordo com o índice de Pielou
741 e não há diferença estatística entre as amostras de solo coletadas em campo sujo e no cupinzeiro,
742 o que indica que esse parâmetro é mais afetado pela sazonalidade do que pela atividade dos
743 cupins.

744 O solo é um dos ecossistemas mais ricos, com cerca de 10.000 espécies bacterianas por
745 grama de solo (ROESCH, 2007). A riqueza é definida como o número de diferentes táxons
746 observados na comunidade sem levar em consideração a sua frequência (WAGNER, 2018).

747 Conclui-se então que as amostras da seca e do campo sujo são aquelas com maior número de
748 OTUs observadas, e são também as amostras mais ricas. É importante ressaltar que a
749 comunidade microbiana pode sofrer uma mudança na (distribuição dos taxons) composição que
750 não acarreta necessariamente em uma mudança efetiva de táxons. Um estudo recente sobre a
751 composição funcional do solo de cupinzeiro mostrou que, apesar de não haver mudanças
752 significativas no número de OTUs, a composição da microbiota variava significativamente
753 entre amostras de solo do cupinzeiro e do solo controle (ENAGBONMA *et al.*, 2019).

754 Diferentes espécies utilizam diferentes recursos. Logo, uma comunidade rica em
755 espécies é mais produtiva porque mais recursos serão utilizados (LOREAU e HECTOR, 2001).
756 No entanto, no ambiente natural as espécies de bactéria são, geralmente, funcionalmente
757 redundantes (YIN *et al.*, 2000), especialmente no solo, em que, apesar de possuir comunidades
758 microbianas altamente numerosas e diversas, estão também geralmente metabolicamente
759 inativas, estabelecendo uma discrepância entre a atividade metabólica e o total de biomassa
760 bacteriana (LAVELLE, 2018). Comunidades pobres em espécies podem ser tão ativas quanto
761 comunidades mais ricas, uma vez que a composição dessa comunidade e a interação entre
762 espécies são variáveis importante para determinar o nível de funcionamento do ecossistema
763 (BELL *et al.*, 2005).

764 Técnicas moleculares de sequenciamento do gene 16s do rRNA permitem identificar
765 espécies de bactérias e compreender a composição da microbiota e a sua relação com elementos
766 abióticos, independente do cultivo desses organismos (ARAUJO *et al.*, 2012; QUIRINO *et al.*,
767 2009; SANTANA *et al.*, 2015). No entanto, apenas o sequenciamento completo do genoma
768 permite o acesso a todos os genes (LANGILLE *et al.*, 2013). Desta maneira, inferências
769 funcionais baseadas nos dados de taxonomia têm conseguido recapturar os principais aspectos
770 funcionais de uma comunidade (FERREIRA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2020; WANG *et al.*,
771 2020), dentro de suas limitações: a não resolução de variações de linhagens dentro de uma
772 espécie, anotação de genes baseada em bancos de dados disponíveis e vieses do processo de
773 sequenciamento (LANGILLE *et al.*, 2013).

774 Quanto mais acesso à informação de sequenciamento, mais percebe-se a presença de
775 dois tipos core de genes: um conjunto grande de genes ou pseudogenes não essenciais e
776 evolutivamente neutros e um conjunto de genes específico e selecionado pelo ambiente.
777 (FALKOWSKI *et al.*, 2008). A análise metagenômica por *shotgun* de cupinzeiros mostrou que
778 o esse solo era funcionalmente similar ao solo adjacente, com exceção da abundância de
779 sequências de virulência, patogenicidade e defesa no cupinzeiro, responsáveis para uma
780 proteção significativa do ninho (ENAGBONMA *et al.*, 2019). A abundância de genes de defesa

781 encontrados no cupinzeiro pode ser explicada pelo extenso reservatório de Actinobacteria
782 geralmente encontrado nesses ninhos (SUJADA *et al.*, 2014), bacterias também associadas a
783 ecossistemas com menor riqueza de espécies (QUIRINO *et al.*, 2009).

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814 7.0 CONCLUSÃO

815

816 Os cupins são conhecidos como engenheiros do ecossistema por conta da sua
817 capacidade de modular o ambiente através de suas atividades. De acordo com esse trabalho, os
818 filos mais relativamente abundantes são comuns às amostras de solo do campo sujo e cupinzeiro
819 e são: Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Proteobacteria,
820 Verrucomicrobia e WPS-2, com maior abundância relativa de Actinobacteria e Proteobacteria
821 para as amostras de cupinzeiro. A interação entre esses grupos microbianos e elementos
822 abióticos do ecossistema ainda é uma questão a ser respondida.

823 A diversidade e a redundância funcional são aspectos de uma comunidade microbiana
824 que permite a coexistência de grupos diferentes capazes de exercer um mesmo processo, o que
825 contribui para a estabilidade do ecossistema. A análise de coordenada principal da comunidade
826 bacteriana das amostras do solo separa as amostras de campo sujo (50-60 cm), cupinzeiro
827 topo (0-10cm) e cupinzeiro profundo (50-60cm) e, pelo índice de Shannon, a amostra do campo
828 sujo é a mais diversa. A estação seca é a mais rica e possui também maior equitabilidade. Ao
829 contrário da estação chuvosa, a seca é, possivelmente, uma estação em que não se observa a
830 predominância de microorganismos específicos no solo.

831 A sazonalidade é uma variável importante para o bioma do cerrado e possui grande
832 influência na microbiota do solo. A umidade possui efeito na distribuição da comunidade e na
833 estrutura bacteriana das amostras de solo de campo sujo e cupinzeiro, demonstrando que o
834 número de OTUs observados nas amostras de solo de campo sujo (50-60cm) diminuem
835 significativamente com o avanço das estações, indicando que a riqueza bacteriana dessa
836 amostra é mais susceptível a mudanças sazonais do que as amostras do cupinzeiro.

837 Os resultados desse trabalho relacionam elementos da comunidade microbiana
838 associada ao solo de cupinzeiro a elementos abióticos presentes no cerrado brasileiro. Esse
839 estudo pode ser objeto de trabalhos posteriores que almejam elucidar a dinâmica existente na
840 interação entre a atividade dos cupins e a microbiota do solo, como a forma na qual a dieta
841 desse animal pode influenciar a microbiota presente no seu ninho e a influência da modulação
842 da microbiota e o macrobioma em sua superfície.

843

844

845

846

847 **8.0 REFERÊNCIAS**

- 848 ALLISON, S. D. e MARTINY, J. B. H. Resistance , resilience , and redundancy in microbial
849 communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (Supplement 1) 11512-
850 11519; 2008.
- 851 AMORIM, P. K. e BATALHA, M. A. Soil characteristics of a hyperseasonal cerrado compared
852 to a seasonal cerrado and a floodplain grassland: Implications for plant community
853 structure. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2 B), 661–670, 2006.
- 854 ANDRADE, S. L. A., e EINSLE, O. The Tricky Task of Nitrate/Nitrite Antiport. *Angewandte*
855 *Chemie International Edition*, 52(40), 10422–10424, 2013.
- 856 ARAUJO, J. F., CASTRO, A. P., COSTA, M. M. C., TOGAWA, R. C., JÚNIOR, G. J. P.,
857 QUIRINO, B. F., ... KRUGER, R. H. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in
858 Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial*
859 *Ecology*, 64(3), 760–770, 2012.
- 860 ARAUJO, A. S. F., MENDES, L. W., LEMOS, L. N., ANTUNES, J. E. L., BESERRA, J. E.
861 A., LYRA, M. do C. C. P., ... GEISEN, S. Protist species richness and soil microbiome
862 complexity increase towards climax vegetation in the Brazilian Cerrado. *Communications*
863 *Biology*, 1(1), 135, 2018.
- 864 BAVEYE, P. C., OTTEN, W., KRAVCHENKO, A., BALSEIRO-ROMERO, M., BECKERS,
865 É., CHALHOUB, M., ... VOGEL, H. J. Emergent properties of microbial activity in
866 heterogeneous soil microenvironments: Different research approaches are slowly
867 converging, yet major challenges remain. *Frontiers in Microbiology*, 1–48, 2018.
- 868 BELL, T., NEWMAN, J. A., SILVERMAN, B. W., TURNER, S. L., LILLEY, A. K. The
869 contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 436(7054),
870 2005.
- 871 BIGNELL, D. E. Termites as model organisms. In: KONIG, H., VARMA, A., *Intestinal*
872 *Microorganisms of Termites and Other Invertebrates*, Springer, 2005. P. 89-114.
- 873 BIGNELL E.B; ROISIN, Y. L. N. Biology of Termites: A Modern Synthesis. *Journal of*
874 *Chemical Information and Modeling* (Vol. 53), Springer, 2013.
- 875 BOKULICH, N. A., SUBRAMANIAN, S., FAITH, J. J., GEVERS, D., GORDON, J. I.,
876 KNIGHT, R., ... CAPORASO, J. G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates
877 from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59, 2013.
- 878 BOLYEN, E., RIDEOUT, J. R., DILLON, M. R., BOKULICH, N. A., ABNET, C. C., AL-
879 GHALITH, G. A., ... CAPORASO, J. G. Reproducible, interactive, scalable and
880 extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–

- 881 857, 2019.
- 882 BONACHELA, J. A., PRINGLE, R. M., SHEFFER, E., COVERDALE, T. C., GUYTON, J.
883 A., CAYLOR, K. K., ... TARNITA, C. E. Termite mounds can increase the robustness of
884 dryland ecosystems to climatic change. *Science*, 347(6222), 651–655, 2015.
- 885 BRAUMAN, A. Effect of gut transit and mound deposit on soil organic matter transformations
886 in the soil feeding termite: A review. *European Journal of Soil Biology*, 36(3–4), 117–
887 125, 2000.
- 888 BREZNAK, J.A., Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. Annual
889 Review of Microbiology 36: 323-323. 1982.
- 890 BROWN, C. M., DILWORTH, M. J. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and
891 bacteroids. *Journal of General Microbiology*, 86(1), 39–48, 1975.
- 892 BRUNE, A. and DIETRICH, C. The gut microbiota of termites: Digesting the Diversity in the
893 Light of Ecology and Evolution. Annual Review of Microbiology 69:1, 145-166. 2015.
- 894 CHANG, L., WEI, L. I.-C., AUDIA, J. P., MORTON, R. A., SCHELLHORN, H. E.
895 Expression of the Escherichia coli NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent
896 and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Molecular*
897 *Microbiology*, 34(4), 756–766, 1999.
- 898 CHIANG, E., SCHMIDT, M. L., BERRY, M. A., BIDDANDA, B. A., BURTNER, A.,
899 JOHENGEN, T. H., ... DENEFF, V. J. Verrucomicrobia are prevalent in north- temperate
900 freshwater lakes and display class- level preferences between lake habitats, *PLOS ONE* 13(3):
901 e0195112. 1–20, 2018.
- 902 CARVALHO, I., FERNANDES, M. F., CHAER, G. M., JUNIOR, F. Biological functioning
903 of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant and Soil*, 359(1–2), 183–
904 195, 2012.
- 905 CLAESSEN, M. E. C., BARRETO, W. de O. *Manual de métodos de análise de solo. Colet.*
906 *Inst. Tecnol. Alimentos* (second, Vol. 26). EMBRAPA. 1996.
- 907 COLEMAN, D. *Soil Fauna: Occurrence, Biodiversity, and Roles in Ecosystem Function.*
908 Chapter 5 in: (pp. 111–149), 2015.
- 909 CONSTANTINO, R. Padrões de diversidade e endemismo de témitas no bioma Cerrado.
910 *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação.*, 319–333, 2005.
- 911 CONSTANTINO, R., ACIOLI, A.N.S. Termite diversity in Brazil. In: MOREIRA, F.M.S,
912 SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian
913 Ecosystems. 2006. Cap 5, 117-129.
- 914 CRUZ-MARTÍNEZ, K., SUTTLE, K. B., BRODIE, E. L., POWER, M. E., ANDERSEN, G.

- 915 L., BANFIELD, J. F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more
916 resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME Journal*, 3(6),
917 738–744, 2009.
- 918 DELGADO-BANQUERIZO, M., OLIVERIO, A. M., BREWER, T. E., BENAVENT-
919 GONZÁLEZ, A., ELDRIDGE, D. J., BARDGETT, R. D., ... FIERER, N. Bacteria Found
920 in Soil. *Science*, 325(February), 320–325, 2018.
- 921 DILLON, R. J., DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions.
922 *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92, 2003.
- 923 DONOVAN, S., EGGLETON, P., BIGNELL, D. Gut content analysis and a new feeding group
924 classification of termites (Isoptera). *Ecological Entomology*, 26, 356–366, 2008 .
- 925 DUTTA, D., DE, D., CHAUDHURI, S., BHATTACHARYA, S. K. Hydrogen production by
926 Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 36, 2005.
- 927 ENAGBONMA, B. J., AREMU, B. R., BABALOLA, O. O. Profiling the Functional Diversity
928 of Termite Mound Soil Bacteria as Revealed by Shotgun Sequencing. *Genes* 10, 2019.
- 929 ESPINOZA, L., SLATON, N., DANIELS, M. The Nitrogen and Phosphorous Cycle in Soils.
930 *Agriculture and Natural Resources* 1–4, 1914.
- 931 FAGERIA, N. K., BALIGAR, V. C. Properties of Termite Mound Soils and Responses of Rice
932 and Bean to Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Fertilization on such Soil.
933 *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35(15–16), 2097–2109, 2005.
- 934 FALKOWSKI, P. G., FENCHEL, T., DeLong, E. F. The microbial engines that drive earth's
935 biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034–1039, 2008.
- 936 FERREIRA, R. M., PEREIRA-MARQUES, J., PINTO-RIBEIRO, I., COSTA, J. L.,
937 CARNEIRO, F., MACHADO, J. C., FIGUEIREDO, C. Gastric microbial community
938 profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*, 67(2), 226 LP – 236, 2018.
- 939 FIERER, N., SCHIMEL, J. P., HOLDEN, P. A. Influence of Drying–Rewetting Frequency on
940 Soil Bacterial Community Structure . *Microbial Ecology*, 45(1), 63–71, 2003.
- 941 FIERER, N., LAUBER, C. L., RAMIREZ, K. S., ZANEVELD, J., BRADFORD, M. A.,
942 KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil
943 microbial communities across nitrogen gradients. *ISME Journal*, 6(5), 1007–1017, 2012.
- 944 GALLOWAY, J. N., ABER, J. D., ERISMAN, J. W., SEITZINGER, S. P., HOWARTH, R.
945 W., COWLING, E. B., COSBY, B. J. The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341–356,
946 2003.
- 947 HAMILTON, C., BULMER, M.S. Molecular antifungal defenses in subterranean termites:
948 RNA interference reveals in vivo roles of termicins and GNBP's against a naturally

- 949 encountered pathogen. *Developmental and Comparative Immunology* 36 372–377
950 Contents. 2012.
- 951 HIGASHI, M., YAMAMURA, N., ABE, T. Termites: Evolution, Sociality, Symbioses,
952 *Ecology* (pp. 169–187), 2000.
- 953 JANSSEN, P. H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and
954 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3) 1719-1728, 2006.
955
- 956 JOST L. The relation between evenness and diversity. *Diversity*, 2(2), 207–232, 2010.
- 957 JOUQUET, P. Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided
958 by termites. *European Journal of Soil Biology*, 47(4), 215–222, 2017.
- 959 KENNEDY, I. R. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. II. Pulse-labelling of
960 serradella nodules with $^{15}\text{N}_2$. *BBA - General Subjects*, 130(2), 295–303, 1966.
- 961 KLINK, C. A. and MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation*
962 *Biology*, 19(3), 707–713, 2005.
- 963 LANGILLE, M. G. I., ZANEVELD, J., Caporaso, J. G., MCDONALD, D., KNIGHTS, D.,
964 REYES, J. A., ... HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial
965 communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 2013.
- 966 LAVELLE, P. and SPAIN, A. Soil Ecology. *Springer*, 2001. 619p.
- 967 LEE, K.E. and WOOD, T.G. Termites and soils. Academic Press, London. 1971.
- 968 LI, Y., DONG, Z. Y., PAN, D. Z., PAN, C. H., CHEN, L. H. Effect of termite on soil pH and
969 its application for termite control in Zhejiang Province, China. *Sociobiology*. 64(3): 317-326.
970 2017.
- 971 LOREAU, M. and HECTOR, A. Partitioning selection and complementarity in biodiversity
972 experiments. *Nature*, 412(6842), 72–76, 2001.
- 973 MACHADO, R. B., NETO, M. G. P., CALDAS, E. F., GONÇALVES, D. a., SANTOS, N. a.,
974 TABOR, K. and STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. ...
975 *International Do Brasil*, ..., 1–23. 2004.
- 976 MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
977 *EMBnet.Journal; Vol 17, No 1: Next Generation Sequencing Data Analysis*, 2011.
- 978 MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. M., ESCLAPEZ, J., BAUTISTA, V. and BONETE, M. J. An
979 octameric prokaryotic glutamine synthetase from the haloarchaeon *Haloferax*
980 *mediterranei*. *FEMS Microbiology Letters*, 264(1), 110–116, 2006.
- 981 MICHEL, D. and BATISTA, J. *Caracterização das estruturas cristalinas de Syntermes*
982 *wheeleri* (*insecta : isoptera : termitidae*). 2013. 19f. Trabalho de conclusão de curso

- 983 (Ciências naturais) – Faculdade UNB Planaltina.
- 984 MIRANDA, H., BUSTAMANTE, M., MIRANDA, A. The fire factor. The Cerrados of Brazil.
985 2002. Cap 4, 51-68.
- 986 MOREIRA, E. A., ALVAREZ, T. M., PERSINOTI, G. F., PAIXÃO, D. A. A., MENEZES, L.
987 R., CAIRO, J. P. F., ... ARAB, A. Microbial Communities of the Gut and Nest of the
988 Humus- and Litter-Feeding Termite *Procornitermes araujoi* (Syntermitinae). *Current*
989 *Microbiology*, 75(12), 1609–1618, 2018.
- 990 NANNIPIERI, P., ASCHER, J., CECCHERINI, M. T., LANDI, L., PIETRAMELLARA, G.
991 and RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil*
992 *Science*, 54(4), 655–670, 2003.
- 993 NARDOTO, G. B., BUSTAMANTE, M. M., PINTO, A. S., KLINK, C. A. Nutrient use
994 efficiency at ecosystem and species level in savanna areas of Central Brazil and impacts
995 of fire. *Journal of Tropical Ecology*, 22(2), 191–201, 2006.
- 996 NEGRET, H.R.C., REDFORD, K. H. The Biology of Nine Termite Species (Isoptera:
997 Termitidae) From the Cerrado of Central Brazil. *Psyche*, 89, 1982.
- 998 OLIVEIRA, D. E., CARRIJO, T. F., BRANDÃO, D. Species Composition of Termites
999 (Isoptera) in Different Cerrado Vegetation Physiognomies. *Sociobiology*, 60(2), 190–197,
1000 2013.
- 1001 PAJARES, S., BOHANNAN, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying
1002 Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1045, 2016.
- 1003 PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections.
1004 *Journal of Theoretical Biology*, 13(C), 131–144, 1966.
- 1005 PIRES, E. *Microbiologia do ciclo do nitrogênio em solos do cerrado*. 2016.81f. Tese de
1006 doutorado (Biologia microbiana) – Departamento de Biologia celular da Universidade de
1007 Brasília.
- 1008 POLLARD, R. The Brazilian Cerrado Vegetation: A Fertility Gradient. *British Ecological*
1009 *Society*, 61(1), 219–224, 2009.
- 1010 QUAIST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., ...
1011 GLOCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data
1012 processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596, 2012.
- 1013 QUIRINO, B. F., PAPPAS, G. J., TAGLIAFERRO, A. C., COLLEVATTI, R. G., NETO, E.
1014 L., SILVA, M. R. S. S., ... KRUGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria
1015 associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research*,
1016 164(1), 59–70, 2009.

- 1017 RAPPE, M. S., GIOVANNONI, S. J. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of*
1018 *Microbiology*, 57(1), 369–394, 2003.
- 1019 REEVES, J., LIEBIG, M., Depth Matters: Soil pH and Dilution Effects in the Northern Great
1020 Plains. *Soil Science Society of America Journal*, 80-5, 1424-1427. 2016.
- 1021 RIBEIRO, J. F., WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. *Cerrado : Ambiente e*
1022 *Flora*, 556, 1998.
- 1023 ROBERTSON, L. a., KUENEN, J. G. *The Prokaryotes- Volume 5. The Prokaryotes* (Vol.
1024 Volume 5), 2006.
- 1025 ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C., MAHE, F. VSEARCH: A versatile
1026 open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), 1–22, 2016.
- 1027 ROULAND-LEFEVRE, C., BIGNELL, D. E. Cultivation of Symbiotic Fungi by Termites of
1028 the Subfamily Macrotermitinae. *Symbiosis*, 731–756, 2006.
- 1029 SANDS, W. A. Termites and Soils By K. E. Lee and T. G. Wood London: Academic Press
1030 pp. 251. *Experimental Agriculture*, 8(3), 281, 1972.
- 1031 SANTANA, R. H., CATAO, E. C. P., LOPES, F. A. C., CONSTANTINO, R., BARRETO, C.
1032 C., KRUGER, R. H. The Gut Microbiota of Workers of the Litter-Feeding Termite
1033 *Syntermes wheeleri* (Termitidae: Syntermitinae): Archaeal, Bacterial, and Fungal
1034 Communities. *Microbial Ecology*, 70(2), 545–556, 2015.
- 1035 SCALON, M. C., HARIDASAN, M., FRANCO, A. C. A comparative study of aluminium and
1036 nutrient concentrations in mistletoes on aluminium-accumulating and non-accumulating
1037 hosts. *Plant Biology*, 15(5), 851–857, 2013.
- 1038 SCHLOSS, P. D., HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS*
1039 *Computational Biology*, 2(7), e92–e92, 2006.
- 1040 SILVA, M. R. S. S. *Produção de serapilheira, biomassa e diversidade de comunidades*
1041 *bacterianas do solo em áreas de Cerrado sob diferentes usos e manejos*. 2004. 85f.
1042 Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de
1043 Brasília.
- 1044 SILVA, M.R.S.S., SILVA, M. R., CASTRO, A.P., KRUGER, R. H., BUSTAMANTE, M. Soil
1045 bacterial communities in the Brazilian Cerrado: Response to vegetation type and
1046 management. *Acta Oecologica*, 100(August), 103463. 2019.
- 1047 SINGH, K., MULJADI, B. P., RAEINI, A. Q., JOST, C., VANDEGINSTE, V., BLUNT, M.
1048 J., ... DEGOND, P. The architectural design of smart ventilation and drainage systems in
1049 termite nests. *Science Advances*, 5(3), 1–12. 2019.
- 1050 SOURCE, P. A. . F. and J. A. . R. Soil Resources and Plant Communities of the Central

- 1051 Brazilian Cerrado and Their Development. *Journal of Biogeography* , Vol . 15 , No . 1 ,
1052 *Biogeography and Development in the Humid Tropics*, 15(1), 97–108. 2009.
- 1053 SUJADA, N., SUNGTHONG, R., LUMYONG, S.. Termite nests as an abundant source of
1054 cultivable actinobacteria for biotechnological purposes. *Microbes and Environments*,
1055 29(2), 211–219. 2014.
- 1056 SUN, C., YUAN, T., CHEN, L., XIE, Z., SHEN, Z. Occurrence of potentially pathogenic
1057 bacteria on shared bicycles. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*,
1058 224, 113442. 2020.
- 1059 TESTONI, S. A., ALMEIDA, J. A., SILVA, L., ANDRADE, G. R. P. Clay mineralogy of
1060 Brazilian oxisols with shrinkage properties. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 41, 1–
1061 16. 2017.
- 1062 TRANIELLO, J. F. A., LEUTHOLD, R. H. Behavior and Ecology of Foraging in Termites.
1063 *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, 141–168. 2000.
- 1064 VANONI, M. A., CURTI, B. Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cellular*
1065 *and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(4), 617–638.1999.
- 1066 HORWATH,W. Carbon cycling and formation of soil organic matter. In: *Soil Microbiology*
1067 *and Biochemistry*, third edition. 2007. Cap 12, 303-337.
- 1068 WANG, Q., ZHAO, L., HAN, L., FU, G., TUO, X., MA, S., ... LI, Q. The differential
1069 distribution of bacteria between cancerous and noncancerous ovarian tissues in situ.
1070 *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 8. 2020.
- 1071 WARNECKE, F., LUGINBUHL, P., IVANOVA, N., GHASSEMIAN, M., RICHARDSON,
1072 T. H., STEGE, J. T., ... LEADBETTER, J. R. Metagenomic and functional analysis of
1073 hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450(7169), 560–565.2007.
- 1074 WITTEBOLLE, L., MARZORATI, M., CLEMENT, L., BALLOI, A., DAFFONCHIO, D.,
1075 HEYLEN, K., ... BOON, N. Initial community evenness favours functionality under
1076 selective stress. *Nature*, 458(7238), 623–626. 2009.
- 1077 YIN, B., CROWLEY, D., SPAROVEK, G., MELO, W. J., BORNEMAN, J. Bacterial
1078 Functional Redundancy along a Soil Reclamation Gradient. *Applied and Environmental*
1079 *Microbiology*, 66(10), 4361 LP – 4365. 2000.
- 1080 YOUNG, I. M., CRAWFORD, J. W. Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe
1081 Complex. *Science*, 304(5677), 1634 LP – 1637. 2004.
- 1082 ZHALNINA, K., DIAS, R., QUADROS, P. D., DAVIS-RICHARDSON, A., CAMARGO, F.
1083 A. O., CLARK, I. M., ... TRIPLETT, E. W. Soil pH Determines Microbial Diversity and
1084 Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395–406. 2014.

1085 **9.0 APÊNDICE**

1086

1087 **1) Tabelas**

1088 **Tabela Suplementar 1. Análise estatística dos filos bacterianos na estação seca para as amostras de campo**
 1089 **sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm).** Método ANOVA e Tukey's test para
 1090 comparar as três amostras: cs (campo sujo), c0 (cupinzeiro 0 cm) e c60 (cupinzeiro 60 cm). "Mean diff," é a
 1091 diferença entre as médias dos valores; "95% CI of diff," significa 95% do intervalo de confiança da diferença entre
 1092 as médias, "Summary" é o sumário das análises significativas (* ou mais) ou não significativas (ns) e valor de p
 1093 ajustado na última coluna como "Adjusted P value".

Tukey's multiple comparisons test - ANOVA				
	Mean Diff,	95% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
Acidobacteria				
cs vs c0	3,14	0,7811 to 5,499	**	0,0062
cs vs. c60	2,087	-0,2722 to 4,446	ns	0,0931
c0 vs. c60	-1,053	-3,412 to 1,306	ns	0,5343
Actinobacteria				
cs vs c0	-15,24	-17,60 to -12,88	****	< 0,0001
cs vs. c60	-10,91	-13,27 to -8,554	****	< 0,0001
c0 vs. c60	4,33	1,971 to 6,689	***	0,0001
Chloroflexi				
cs vs c0	3,94	1,581 to 6,299	***	0,0005
cs vs. c60	2,583	0,2245 to 4,942	*	0,0286
c0 vs. c60	-1,357	-3,716 to 1,002	ns	0,3566
Planctomycetes				
cs vs c0	5,033	2,674 to 7,392	****	< 0,0001
cs vs. c60	5	2,641 to 7,359	****	< 0,0001
c0 vs. c60	-0,03333	-2,392 to 2,326	ns	0,9994
Proteobacteria				
cs vs c0	-3,29	-5,649 to -0,9311	**	0,0039
cs vs. c60	-4,983	-7,342 to -2,624	****	< 0,0001
c0 vs. c60	-1,693	-4,052 to 0,6655	ns	0,2043
Verrucomicrobia				
cs vs c0	4,593	2,234 to 6,952	****	< 0,0001
cs vs. c60	4,103	1,744 to 6,462	***	0,0003
c0 vs. c60	-0,49	-2,849 to 1,869	ns	0,872
others				
cs vs c0	0,7133	-1,646 to 3,072	ns	0,7487
cs vs. c60	0,8967	-1,462 to 3,256	ns	0,6339
c0 vs. c60	0,1833	-2,176 to 2,542	ns	0,981

1094

1095

1096

1097 **Tabela Suplementar 2. Valores de correlação das variáveis nitrato, umidade, amônio e pH com os eixos do**
 1098 **gráfico de análise de componente principal (PCA).** O nitrato e amônio estão representados em suas fórmulas
 1099 [N-NO₃] e [N-NH₄] respectivamente. Os eixos dispostos estão de acordo com as duas dimensões do gráfico, PC1
 1100 (31%) e PC2 (27,6%).

1101

	PC1	PC2
[N-NO ₃]	-0,51	0,53
umidade	0,73	0,28
[N-NH ₄]	0,23	0,83
pH	0,62	-0,2

1102

1103

1104

1105

1106 **Tabela Suplementar 3. Números EC obtidos a partir da análise de inferência funcional das amostras do**
 1107 **campo sujo e cupinzeiro relacionados ao metabolismo de N na estação seca.** A análise funcional a partir da
 1108 taxonomia permite a associação de um determinado grupo de táxons e a proporção de sequências para uma
 1109 determinada enzima (#OTU ID). A análise estatística foi feita para os grupos do campo sujo, cupinzeiro 0 cm e
 1110 cupinzeiro 60cm e os grupos significativos estão dispostos na última coluna.

#OTU ID	cs	c0	c60	significativo?
EC:1.18.6.1	15440	15098	12318	
EC:1.7.7.1	21559	20844	20264	
EC:1.7.2.2	670	438	1023	
EC:1.7.2.1	3382	3728	2375	
EC:1.7.2.4	3361	3543	2313	
EC:1.1.5.3*	75324	87308	80029	cs vs c0 *
EC:1.14.99.39	651	556	592	
EC:1.7.2.6	88	48	65	
EC:1.7.2.5	3818	4085	2950	
EC:1.7.2.4	3361	3543	2313	
EC:1.14.13.25	3	4	1	
EC:6.3.1.2*	184059	202370	190113	cs vs c0; c0 vs c60 ***
EC:1.4.1.14	125500	131432	125720	
EC:1.4.1.13	125500	131432	125720	
EC:1.4.7.1	24413	24500	21758	

1111

1112

1113 **Tabela Suplementar 4. Números EC obtidos a partir da análise de inferência funcional que são**
 1114 **significativamente diferentes entre as amostras do campo sujo e cupinzeiro relacionados ao metabolismo**
 1115 **de N nas estações seca, chuvosa e a transição.** A análise funcional a partir da taxonomia permite a associação
 1116 de um determinado grupo de táxons e a proporção de sequências para uma determinada enzima (#OTU ID).
 1117 A análise estatística foi feita para os grupos do campo sujo, cupinzeiro 0 cm e cupinzeiro 60cm.

1118

#OTU ID	Cs-seca	cs-trans	cs-chuva	c0-seca	c0-trans	c0-chuva	c60-seca	c60-trans	c60-chuva
EC:6.3.1.2	161919	189888	200369	198417	203146	205547	202076	187095	181168
EC:1.4.1.14	115577	127986	132937	127069	134904	132323	131168	121904	124088
EC:1.4.1.13	115577	127986	132937	127069	134904	132323	131168	121904	124088

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

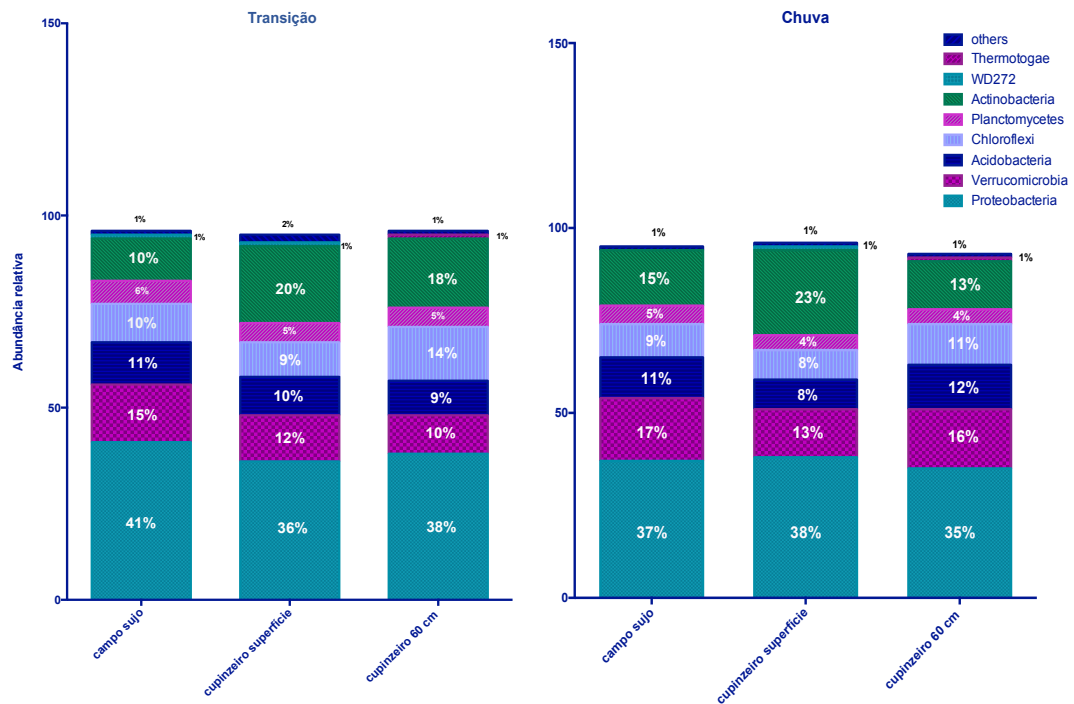
1126

1127

1128

1129 2) Figuras complementares

1130

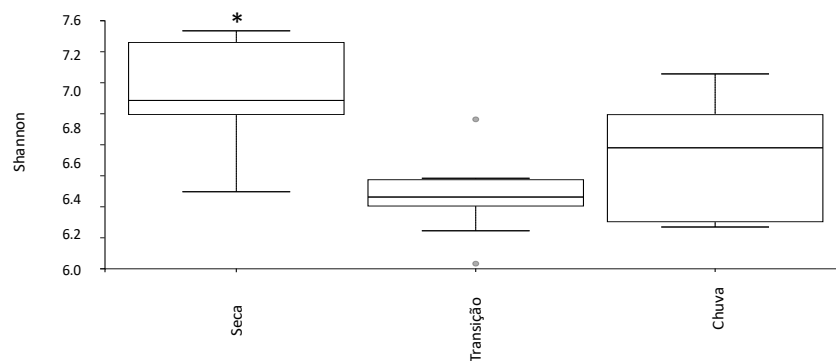


1131

1132 **Figura Suplementar 1) Abundância relativa dos grupos bacterianos na estação chuvosa e a transição em**
 1133 **relação às amostras de campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm).** As amostras
 1134 do cupinzeiro 0 cm estão representadas pelo 'cupinzeiro superfície' e grupos bacterianos raros (que representam
 1135 menos de 1% da comunidade) estão representados como 'others'.

1136

1137

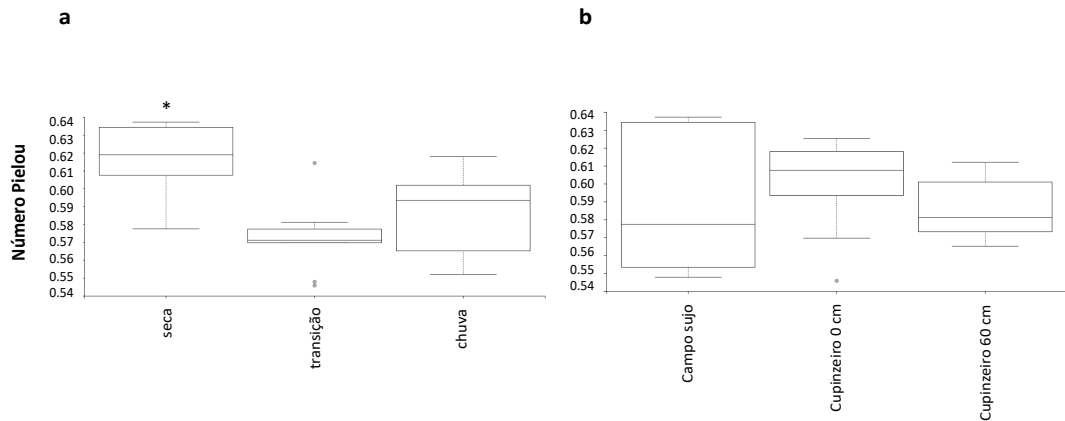


1138

1139 **Figura Suplementar 2. Valor do índice de Shannon para diversidade bacteriana das amostras de solo**
 1140 **coletados no IBGE em Brasília para as estações seca, chuvosa e a transição em 2017 e 2018.** As estações estão
 1141 dispostas no eixo x do gráfico e os valores do índice de Shannon no eixo y. Valores significativos foram
 1142 considerados com o valor de $p < 0,05$ e estão indicados com '*'.

1143

1144



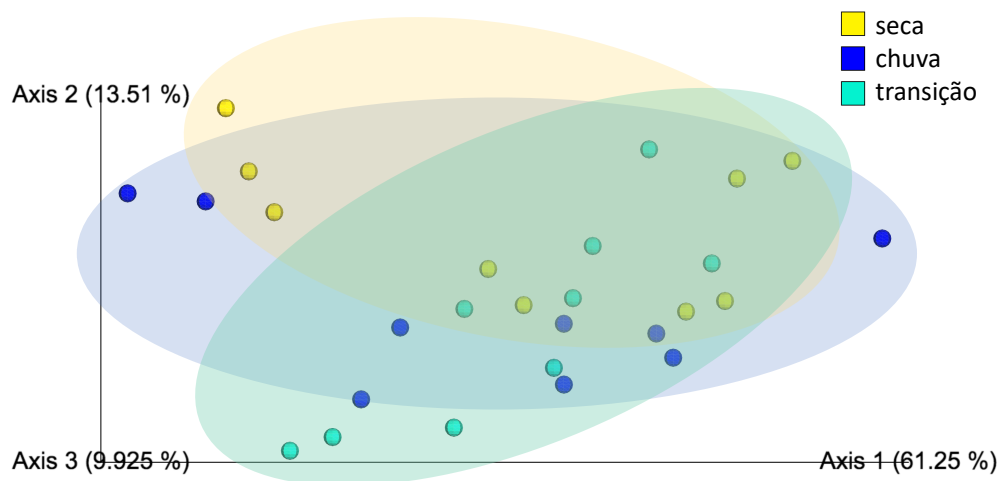
1145

1146 **Figura Suplementar 3. Valor do número de Pielou para equitabilidade bacteriana das amostras de solo de**
 1147 **campo sujo (60cm), cupinzeiro topo (0cm) e cupinzeiro profundo (60cm) coletados no IBGE em Brasília**
 1148 **para as estações seca, chuvosa e a transição em 2017 e 2018. As estações (a) e as amostras de campo sujo e**
 1149 **cupinzeiro (b) estão dispostos no eixo x enquanto o número de Pielou para equitabilidade está no eixo y. Valores**
 1150 **significativos foram considerados com o valor de $p < 0,05$ e estão indicados com ‘*’.**

1151

1152

1153



1154

1155 **Figura Suplementar 4. Análise de coordenada principal (PCoA) dos dados de inferência funcional das**
 1156 **amostras de solo para as estações seca, chuvosa e a transição. Coordenadas principais da análise de Bray Curtis**
 1157 **separam as amostras da seca sujo em amarelo, chuva em azul e transição em verde (Axis 1 – 61,25%; Axis 2 –**
 1158 **13,51% e Axis 3 – 9,925%).**

1159

1160

1161 **10. ANEXOS**

1162

1163 **1) Participação em eventos científicos**

1164

1165

ISME 17**Leipzig**

**DECLARATION OF ATTENDANCE ISME17
CCL Leipzig, Germany, 12-17 August 2018**

The International Society for Microbial Ecology (ISME), organizer of the 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME17) in Leipzig, Germany, from 12 – 17 August 2018, hereby declares that the following delegate attended ISME17:

Name: Helena Guimarães
University/Institute: University of Brasília
Country: Brazil

And contributed to a **Poster** presentation in the following session:

Session Title: PS14 - Frontiers of soil microbial ecology

Abstract Title: Characterization of Cerrado soil microbiota associated with mounds of the *Syntermes wheeleri* termite

Day: 16.08.2018

Sincerely yours,

Sarash de Wilde
ISME Office

Disclaimer: An ISME Officer checks all declarations for validity before signing. However, ISME does not accept any responsibility or liability for the accuracy, content and/or completeness of the information contained on this declaration of attendance.



1166

1167

1168



Certificate of Participation

July 20, 2019

Helena Ipê Guimarães
Unb
asa norte campus darcy ribeiro instituto de biologia
brasilia, 70.904-970
Brazil

Dear Helena Ipê,

This letter certifies your participation as a Poster Presenter at the Gordon Research Conference on Applied and Environmental Microbiology held July 14, 2019 - July 19, 2019 at Mount Holyoke College in South Hadley, MA United States.

Thank you for your poster presentation entitled: Termite associated soil alters microbial pattern of Brazilian Savannah soil during dry season

Sincerely,
Dr. Nancy Ryan Gray, President and Chief Executive Officer
Gordon Research Conferences

1169



1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

2) Papers publicados

1178



Medical Mycology, 2019, 0, 1–13
doi: 10.1093/mmy/myz042
Advance Access Publication Date: 0 2019
Original Article



Original Article

Immunomodulatory activity of β -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*

A. M. M. Basso¹, R. J. A. De Castro¹, T. B. de Castro¹, H. I. Guimarães²,
V. L. P. Polez², E. R. Carbonero³, V. H. Pomin^{4,5}, C. Hoffmann⁶,
M. F. Grossi-de-Sa^{2,7}, A. H. Tavares^{1,†} and A. L. Bocca^{1,†}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil, ²Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil, ³Department of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Catalão, GO, Brazil, ⁴Program of Glicobiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University Federal of Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ⁵Department of BioMolecular Sciences, Division of Pharmacognosy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, the University of Mississippi, Oxford, MS 38677-1848, USA, ⁶Department of Food Sciences and Experimental Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁷Graduated Program in Genomic Science and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. AL Bocca, PhD, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil. Tel: 55(61)31073056; E-mail: albocca@unb.br

†A. H. Tavares and A. L. Bocca share senior authorship for this manuscript.

Received 29 January 2019; Revised 1 April 2019; Accepted 12 April 2019; Editorial Decision 7 April 2019

Abstract

Current antifungal drugs present poor effectiveness and there is no available vaccine for fungal infections. Thus, novel strategies to treat or prevent invasive mycosis, such as cryptococcosis, are highly desirable. One strategy is the use of immunomodulators of polysaccharide nature isolated from mushrooms. The purpose of the present work was to evaluate the immunostimulatory activity of β -(1,3)-glucan-containing exopolysaccharides (EPS) from the edible mushrooms *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. EPS triggered macrophages and dendritic cell activation upon binding to Dectin-1, a pattern recognition receptor of the C-type lectin receptor family. Engagement of Dectin-1 culminated in pro-inflammatory cytokine production and cell maturation via its canonical Syk-dependent pathway signaling. Furthermore, upon EPS treatment, M2-like phenotype macrophages, known to support intracellular survival and replication of *C. neoformans*, repolarize to M1 macrophage pattern associated with enhanced production of the microbicidal molecule nitric oxide that results in efficient killing of *C. neoformans*. Treatment with EPS also upregulated transcript levels of genes encoding products associated with host protection against *C. neoformans* and Dectin-1 mediated signaling in macrophages. Finally, orally administrated β -glucan-containing EPS from *A. auricular* enhanced the survival of mice infected with *C. neoformans*. In conclusion, the results demonstrate that EPS from *A. auricular* exert immunostimulatory activity in phagocytes and induce host protection against *C. neoformans*, suggesting that polysaccharides from this mushroom may be promising as an adjuvant for vaccines or antifungal therapy.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, macrophages, β -glucan, *Auricularia auricular* exopolysaccharides.

Introduction

Over the last few decades, the prevalence of fungal diseases has increased considerably. In fact, systemic fungal diseases such as

candidiasis, histoplasmosis, and cryptococcosis are nowadays common, partially due to the global human immunodeficiency virus (HIV) epidemic and other immunosuppressive conditions.¹

1179

1180

1181
1182
1183
1184
1185

Applied Geochemistry 112 (2020) 104474



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Geochemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/apgeochem>



H₂ dynamics in the soil of a H₂-emitting zone (São Francisco Basin, Brazil): Microbial uptake quantification and reactive transport modelling

Andrey Myagkiy^{a,b}, Fabrice Brunet^{a,*}, Claudia Popov^c, Ricardo Krüger^c, Helena Guimarães^c,
Rafaella Silveira Sousa^c, Laurent Charlet^a, Isabelle Moretti^{b,d}

^a Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR, ISTERRE, Grenoble, France

^b Engie SA, Paris, France

^c Enzymology Laboratory, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^d E2S, University of Pau and the Pays de l'Adour, Pau, France

A B S T R A C T

Sandy kaolinite-rich soils, collected in a H₂-emitting circular depression (ca. 500 m in diameter), located in the São Francisco basin (Brazil), were exposed to H₂ gas concentrations in the 500–5000 ppm range for up to eight weeks. The samples were found to consume H₂ at a rate of approximately 0.05–0.1 mmol H₂/soil kg/day due to the microbial activity. DNA extraction from these soil samples before and after H₂ exposure, followed by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) and 16S rRNA gene amplicon sequencing, indicated that (i) the bacterial community is dominated by phyla that have been previously recognized to scavenge atmospheric H₂, and (ii) H₂ exposure leads to a significant modification of the bacterial community distribution. Measured H₂ uptake rates were fitted to the integrated form of the Michaelis-Menten equation and were further implemented in a 1-D reactive transport model. The model simulates gas-soil interactions in a 1-m vertical soil column, assuming homogeneous distribution of H₂-consuming bacteria. The evolution of the H₂ concentration in the unsaturated soil porosity along the column was simulated considering two different scenarios: a deep H₂ source (*Case 1*) and a biogenic surface source (*Case 2*). It was shown that, in the case of diffusion-dominated H₂-transport as considered in this study, bacterial activity will control the amplitude of the H₂ flux across the column. Moreover, we determined that bacterial activity can dramatically decrease the H₂ concentration in the soil porosity, by a factor of two compared to the source concentration. According to the simulation, the time-resolved concentration data collected in the São Francisco depression [Prinzhofer et al., 2019; *International Journal of Hydrogen Energy*] are consistent with the combination of a deep (*Case 1*) and a surficial biogenic (*Case 2*) H₂ source in this locality.

1. Introduction

Dihydrogen (H₂) is an appealing source of energy that is expected to play a central role in energy transition. Currently however, H₂ is mostly produced by reforming of methane, a process which generates large amounts of CO₂. In the quest for “greener” hydrogen, natural sources of hydrogen are attracting increasing interest. Whereas different processes of natural H₂ production have been identified (e.g., Wakita et al., 1980; Janecky and Seyfried, 1986; Savary and Pagel, 1997; Nandi and Sengupta, 1998), the evaluation of the H₂ resource volume and the definition of reliable exploration tools are two main scientific challenges that need to be tackled. To date, the only exploited geological accumulation of natural H₂ is located north of Bamako at Bourakebougou, in Mali. Since 2011, a pilot well has been producing a gas composed of 98% H₂ (Briere and Jerzykiewicz, 2016; Prinzhofer et al., 2018), which is converted into electricity for local use. Despite the known difficulty in storing H₂, a small and highly diffusive molecule, the Bourakebougou example demonstrates that natural H₂ can actually accumulate, at least

transiently, in porous geological formations. Dolerite sills and aquifers have been identified as likely H₂-upward-migration barriers (Prinzhofer et al., 2018).

Whereas the background atmospheric H₂ concentration is close to 0.5 ppm (Ehhalt et al., 1977; Schmidt, 1978), H₂ concentrations above a few hundred ppm have been measured at approximately 1 m below the surface in circular depressions located in Central Russia (Larin et al., 2010, 2015), in the Carolina Bay, United States (Zgonnik et al., 2015), in Mali (Prinzhofer et al., 2018) and in South-Eastern Brazil (Prinzhofer et al., 2019). Dihydrogen daily emissions were estimated at a few thousandths to a few tenths of thousandths of cubic meters of H₂ per km². Prinzhofer et al. (2019) installed a series of seven H₂ sensors in a circular depression of the São Francisco basin (Minas Gerais, Brazil) in order to monitor H₂ soil concentrations at 80 cm depth. The soil H₂ concentration data have been collected since mid-2019, at 1-h intervals. The H₂ concentration dataset published in Prinzhofer et al. (2019) corresponds to the first 2 months of monitoring. Concentrations were found to be highly variable, with daily pulses lasting between 6 and 12

* Corresponding author.

E-mail address: fabrice.brunet@univ-grenoble-alpes.fr (F. Brunet).

<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104474>

Received 10 April 2019; Received in revised form 15 November 2019; Accepted 16 November 2019

Available online 18 November 2019

0883-2927/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1186

1187