Consórcio de BioEducação

Universidade Lúrio, Universidade Zambeze, Instituto Superior Politécnico de Manica, Parque Nacional da Gorongosa e Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia de Conservação

Efeito do tipo de solo e regime de fogo no microbioma do solo e na resposta fisiológica de duas espécies prioritárias de Miombo: *Brachystegia spiciformis* Benth. e *Brachystegia boehmii* Taub. no Parque Nacional da Gorongosa

Camilo Bruno Samuel António

Supervisoras: Ana Ribeiro-Barros, Ph.D.

Cristina Máguas-Hanson, Ph.D.

Ivete Maquia, M.Sc.

27 de Março de 2020

Consórcio de Bio-Educação
Universidade Lúrio, Universidade Zambeze, Instituto Superior Politécnico de Manica, Parque Nacional da Gorongosa, Universidade de Lisboa

Programa de Mestrado em Biologia de Conservação

Efeito do tipo de solo e regime de fogo no microbioma do solo e na resposta fisiológica de duas espécies prioritárias de Miombo: *Brachystegia spiciformis* Benth. e *Brachystegia boehmii* Taub. no Parque Nacional da Gorongosa

Camilo Bruno Samuel António

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biologia de Conservação como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Conservação

Aprovada por

(supervisor)

(co-supervisor)

(co-supervisor)

(coordenador do Consórcio)

Parque Nacional da Gorongosa, 27 de Março de 2020

Declaração de honra

Declaro por minha honra que o presente trabalho intitulado "Efeito do tipo de solo e regime de fogo no microbioma do solo e na resposta fisiológica de duas espécies prioritárias de Miombo: *Brachystegia spiciformis* Benth. e *Brachystegia boehmii* Taub. no Parque Nacional da Gorongosa, foi por mim elaborado, sob orientação das professoras Ana Ribeiro-Barros e Cristina Máguas-Hanson. Este Trabalho é resultado de uma investigação que não foi submetido para outro grau ou finalidade que não o indicado "**Mestrado em Biologia de Conservação**" pelo consórcio BioEducação: Universidade Lúrio, Universidade Zambezi, Instituto Superior Politécnico de Manica e Parque Nacional da Gorongosa, Moçambique.

O Autor

Camilo Bruno Samuel António

(Camilo Bruno Samuel António)

Chitengo, 27 de Março de 2020

Dedicatória

À minha mãe (Maria Helena José Samuel), pelo incentivo e carinho nas horas de desespero e por sempre me apoiar em momentos difíceis.

Agradecimentos

Um trabalho de mestrado envolve inúmeros desafios durante a longa viagem, que inclui trajectórias de sucessos e fracassos, alegrias e tristezas pelo caminho, mas apesar de todo sacrifício sofrido reúne contributos de várias pessoas indispensáveis. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, motivação, forca e energia de pessoas muito queridas a quem dedico especialmente esta dissertação.

À Deus por estar sempre presente em minha vida me dando força e saúde em momentos difíceis.

As minhas orientadoras Professora Ana Ribeiro-Barros e Professora Cristina Máguas-Hanson, por terem aceitado a responsabilidade de orientar o presente trabalho, pelo seu esforço e orientação incansável, sempre dispostas e bem-humoradas.

À minha família: Maria Helena (Mãe) António Rafael (Pai) Adilson Amorim (irmão) Letícia Mendes (Irmã) por proporcionar momentos únicos em situações difíceis em que o trabalho estava difícil.

Quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Parque Nacional da Gorongosa em especial ao Departamento Científico que contribuiu para a concretização deste trabalho.

Quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane pelo apoio técnico e laboratorial para a extracção de DNA das amostras de solo em particular a Ivete Maquia.

Quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos à Universidade de Lisboa, através do LEAF, Instituto Superior de Agronomia e do CE3C, Faculdade de Ciências pelas actividades formativas de bioinformática e isótopos.

Agradeço aos colegas do primeiro curso mestrado em Biologia de Conservação intitulado **G12**, António, Amina, Gold, Adija, Semo, Lorena, Victor, Raimundo, Clotilde, Márcio e Amemarlita pela oportunidade de conviver com pessoas com formações, trajectórias e histórias de vida tão

distintas, mas que por compartilhar muitos sonhos e anseios, acabaram se fazendo tão amigos em tão pouco tempo. Foram muito importantes para mim, amigos e amigas que não precisarão estar pertos para se fazerem presentes.

Aos docentes do curso pela aprendizagem e pronta disposição em ajudar em tudo que foi necessário dentro e fora da sala de aulas.

Aos funcionários do consórcio (Engª. Msc Berta Guambe e Professora Tara Massad) que sempre estiveram presentes para me orientar no que foi preciso.

Aos meus grandes amigos (João, dr. Geraldo, Gabriela Cúrtiz, Isabel, Anaberta, Alberto, Margarida, Norina, Jacinto, Ago, Lucas, Hélio João- toco, Abel e Hermenegildo) que continuam muito presentes em minha vida e pela valiosa parceria, auxílio na realização deste trabalho.

À minha equipe de futebol (vermelhos) do Parque Nacional da Gorongosa, por proporcionar momentos únicos em situações difíceis em que o trabalho estava difícil.

Ao meu grande e único irmão Adilson, pelo companheirismo, tolerância e apoio ao dividirmos juntos o mesmo lar.

Ao meu sobrinho (Marlon) e Sandra por estarem sempre presentes e alegrando me quando mais precisava.

À minha namorada Laura pela paciência, apoio e carinho durante os dois anos de ausência na formação.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Epígrafe

"Take up one idea. Make that one idea your life-think of it, dream of it, live on that idea. Let the brain, muscles, nerves, every part of your body, be full of that idea, and just leave every other idea alone. This is the way to success".

Swami Vivekananda (1863)

Índice

Declaração de honra ii
Dedicatória ii
Agradecimentos iii
Epígrafe v
Índice vi
Lista de Tabelas viii
Lista de Figuras ix
Lista de abreviaturas xi
Lista de apêndices xii
Resumo xiii
Abstract xiv
CAPÍTULO I 1
1. Introdução geral 1
1.1. Miombo e sua importância 1
1.2. Distribuição e ecologia da floresta de Miombo em Moçambique 2
1.3. Microbioma do solo 4
1.4. Metagenómica 6
1.5. Ecologia isotópica 7
CAPÍTULO II 14
2. Metagenómica de solos e Ecologia isotópica 14
2.1. Introdução 14
2.2. Metodologia 17
2.2.1. Área de estudo 17
2.2.2. Amostragem 17
2.2.3. Extracção de DNA genómico, quantificação e determinação de grau de pureza e integridade e amplificação 18
2.2.4. Sequenciação por Illumina MiSeq e análise bioinformática 19
2.2.5. Análise de composição isotópica e análise elementar 20

2.3. Resultados 21
2.3.1. Análise Metagenómica 21
2.3.1.1. Resultados da sequenciação 21
2.3.1.2. Distribuição de OTUs 22
2.3.1.3. Distribuição das espécies de bactérias mais comuns 22
2.3.1.4. Análise funcional das comunidades bacterianas 23
2.3.1.5. Distribuição de bactérias fixadoras de nitrogénio 23
2.3.1.6. Diversidade de comunidades e curva de rarefação 24
2.3.1.7. Análise de coordenadas principais (PCoA) 24
2.3.2. Ecologia de isótopos 25
2.3.2.1. Tendência geral das razões isotópicas do nitrogénio e carbono e dos conteúdos em C e N 25
2.3.2.2. Variação da razão isotópica (δ15N δ13C) e de C/N 25
2.3.2.3. Análise de componentes principais dos isótopos 25
2.4. Discussão 26
2.4.1. Sequenciamento, Análise de OTUs e Diversidade Funcional 26
2.4.2. Diversidade da comunidade 28
2.4.3. Ecologia Isotópica 29
3. Conclusões e perspectivas futuras 34
3.1. Referências bibliográficas 58
Apêndices 80

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Lista dos tipos de solo, frequência de fogo, código de amostras e coordenadas geográficas; SBSP (amostra de solo de *B. spiciformis*), SBBP (amostras de solo de *B. boehmii*). 36

Tabela 2.2: Distribuição de OTUs nos dois regimes de fogo (alta e baixa frequência) em solos argilosos e arenosos para as espécies em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii.*..... 37

Tabela 2.3: Média e desvios padrão das razões de isótopos de nitrogénio ($\delta^{15}N$), carbono ($\delta^{13}C$), % de nitrogénio tecidual, % de carbono tecidual e rácio de C/N de *B. spiciformis* e *B. boehmii*, em solos argilosos e arenoso e em regime de alta e baixa FF..... 38

Tabela 2.4: Análise de $\delta^{15}N$ nos dois regimes de fogo (alta e baixa frequência) em solos argilosos e arenosos para as espécies em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii.*..... 39

Tabela 2.5: Análise de homogeneidades das médias nas variáveis significativas $^{\delta 15}N$ *B. boehmii* (MS = 15.62, df = 14)..... 40

Lista de Figuras

Figura 1.1: Mapa da vegetação de África, mostrando Miombo em verde escuro. Fonte: Ribeiro et al. 2015. 11

Figura 1.2: Distribuição do Miombo ao longo de Moçambique. Fonte: Marzoli 2007. 12

Figura 1.3: Esquema de integração da biologia de sistemas com outros campos da biologia (molecular, celular, fisiológica, organizacional e ecológica). Fonte: Guiterrez et al. 2005. 13

Figura 2.1: Localização geográfica da área de estudo, com os pontos de amostragem assinalados (círculos pretos). Fonte: Autor 2019. 41

Figura 2.2: Abundância relativa dos principais grupos taxonómicos ao nível do filo na rizosfera das duas espécies em estudo, *B. spiciformis* e *B. boehmii*, em solos argiloso e arenosos em regime de alta e baixa FF. Os filos com OTUs <1% e não identificados estão agrupados como outros. 42

Figura 2.3: Abundância relativa das espécies mais comuns na rizosfera das duas espécies em estudo (B. spiciformis e B. boehmii) em solos argilosos e arenosos em regime de alta e baixa FF. Setas: alterações mais proeminentes na rizosfera de cada espécie e tipo de solo, em função do regime de fogo. 43

Figura 2.4: Categorias funcionais do metagenoma da rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* em alta e baixa FF produzido usando dados da ontologia dos subsistemas de nível 1. 44

Figura 2.5: Frequência relativa (%) das actividades funcionais das bactérias promotoras de crescimento. 45

Figura 2.6: Frequência relativa (%) das actividades funcionais das bactérias promotoras de crescimento no pool geral de amostras. 46

Figura 2.7: Abundância relativa de OTUs de bactérias fixadoras de nitrogénio na rizosfera das duas espécies em estudo (*B. spiciformis* e *B. boehmii*) em solos argilosos e arenosos. Setas: alterações mais proeminentes na rizosfera de cada espécie e tipo de solo, em função do regime de fogo. 47

Figura 2.8: Estimativa da diversidade microbiana através do índice Shannon (azul) e diversidade inversa de Simpson (laranja) na rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* em áreas de alta e baixa frequência de fogo. 48

Figura 2.9: Curva de rarefacção das diferentes amostras microbianas da rizosfera de *B. boehmii* (vermelho) e de *B. spiciformis* (azul). 49

Figura 2.10: Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando as relações de similaridade entre amostras da comunidade bacteriana pertencentes à rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* usando a métrica de distância ponderada do UniFrac: (A) Regime de fogo (PC1 *vs* PC3); (B) Tipo de solo (PC3 *vs* PC2; e (C) Espécie (PC1 *vs* PC2). O vermelho (quadrado) e o azul (círculo) indicam as espécies *B. spiciformis* e *B. boehmii*, respectivamente. 50

Figura 2.11: Abundância natural de $\delta^{15}N$ nos tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul baixa FF. 51

Figura 2.12: Abundância natural de $\delta^{13}C$ nos tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul baixa FF. 52

Figura 2.13: Razão isotópica entre abundância natural de %N e %C representada por C/N nos dois tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul indica baixa FF. 53

Figura 2.14: Análise de coordenadas principais, mostrando relações de similaridade entre as amostras de folhas de *B. spiciformis* e *B. boehmii* nos solos argiloso e arenoso de zonas de alta e baixa FF. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado *B. boehmii*. O vermelho indica alta FF. e o azul baixa FF. 54

Lista de abreviaturas

ºC - Graus Centígrados

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ANOVA - Análise de Variância

D.O - Densidade Óptica

FF - Frequência de Fogo

N - Nitrogénio

MG-RAST - *Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*/Anotações Rápidas Metagenómicas com Tecnologia de Subsistemas

OTUs - *Operational Taxonomic Unit*/Unidade Taxonómica Operacional

PCoA - Principal Component Analysis/Análise de Componentes Principais

PCR - Polymerase Chain Reaction/Reacção em Cadeia da Polimerase

PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria/*Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

PNG - Parque Nacional da Gorongosa

QUIIME - *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*/Análise Quantitativa da Ecologia Microbiana

SBBP - Rizosfera de *Brachystegia boehmii*

SBSP - Rizosfera *Brachystegia spiciformis*

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*/Média Aritmética não Ponderada entre Grupos de Comparação

$\delta^{13}C$ - Isótopo de Carbono

$\delta^{15}N$ - Isótopo de Nitrogénio

‰ – Permilagem

Lista de apêndices

Apêndice 1: Controlo de qualidade de amostras de DNA do solo 80

Apêndice 2: Índices de diversidade da comunidade 81

Apêndice 3: Análise de variância nos dois regimes de fogo (alta e baixa) em solos argilosos e arenosos para a espécie em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii* 82

Resumo

O Miombo é o ecossistema mais extenso e importante de Moçambique e da África Austral. Este ecossistema consiste em floresta adaptada a condições climáticas severas como elevadas temperaturas e baixa precipitação. Possui um valor ambiental e socioeconómico insubstituível, desempenhando funções primordiais no balanço de energia, água e carbono, e contribuindo para as economias formais e informais das comunidades urbanas e rurais. Contudo, a sua estrutura e composição vêm sendo ameaçadas por mudanças climáticas e pressão antropogénica, que colectivamente impõem elevadas frequências e intensidades de fogo, que a médio e longo prazo poderão reduzir a abundância de espécies e comprometer o funcionamento do ecossistema. Neste estudo efectuou-se a caracterização do microbioma do solo (por sequenciação do gene ribossomal *16S rDNA*) e a análise de ecologia de isótopos estáveis ($\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$) de duas espécies típicas do ecossistema de Miombo, *Brachystegia boehmii* e *Brachystegia spiciformis*, em dois tipos de solo (arenoso e argiloso) e sob dois regimes de fogo, elevada frequência (fogos anuais) e baixa frequência (último fogo há mais de 6 anos). As espécies em estudo são leguminosas arbóreas negligenciadas, cuja capacidade de fixação de nitrogénio é ainda desconhecida. O estudo foi efectuado numa das zonas de conservação mais valiosas de África e um dos maiores repositórios de biodiversidade ao nível global, o Parque Nacional da Gorongosa. De acordo com a análise do microbioma, os filos *Actinobacteria, Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* foram os mais abundantes, possuindo uma vasta gama de funções ecológicas, tais como fixação de nitrogénio, decomposição de matéria recalcitrante e promoção do crescimento vegetal. O estudo indica uma forte relação entre a combinação das três variáveis (regime de fogo, tipo de solo e espécie) e a diversidade microbiana do solo, observando-se uma maior diversidade em solos argilosos sob regime de alta frequência de fogo. Relativamente à ecologia isotópica, as amostras colectadas em solos argilosos de áreas com baixa frequência de fogo apresentaram valores mais enriquecidos de $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$. Embora os valores de $\delta^{15}N$ não tenham sido conclusivos, no caso de *B. boehmii* a simbiose com rizóbio, ou seja, a fixação simbiótica de nitrogénio, parece estar activa. Qualquer um dos dois isótopos (^{15}N e ^{13}C) apresentou um potencial adequado de discriminação de espécies, confirmando a sua utilidade para estudos de verificação de mecanismos fisiológicos e das vias de ciclagem de nutrientes em ecossistemas terrestres.

Palavras-chave: carbono, isótopos estáveis, metagenómica, microbioma, nitrogénio, rizosfera.

Abstract

Miombo is the more extensive and important ecosystem from Mozambique and southern Africa. This ecosystem consists of forest trees adapted to severe climate conditions such as, high temperatures and low rainfall, and has irreplaceable environmental and socioeconomic value, playing key roles in energy, water and carbon balance. Moreover, Miombo is of utmost relevance to formal and informal economies of urban and rural communities. However, its structure and composition has been threatened by climate changes and anthropogenic pressures, which collectively impose high frequencies and intensities of fire, that in the medium and long term can reduce species abundance and compromise ecosystem functioning. In this study, the soil microbiome (sequencing of the ribosomal gene *16S rDNA*) and stable isotope ecology ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) were characterized for two typical species of the Miombo ecosystem, *Brachystegia boehmii* and *Brachystegia spiciformis* in two soil types (sandy and clay) and in areas subjected to two fire regimes (high and low frequency). Both species are neglected legume trees, whose symbiotic nitrogen-fixing capacity is not yet studied. The study was conducted in one of Africa's most valuable conservation areas and one of the largest repositories of biodiversity globally, the Gorongosa National Park. According to the microbiome analysis, the dominant phyla were *Actinobacteria, Acidobacteria* e *Proteobacteria Firmicutes, Verrucomicrobia,* which serve a wide range of ecological functions, such as nitrogen fixation, decomposition of recalcitrant soil matter and promotion of plant growth. In general, there was a strong relationship between fire regime, soil type and tree species, with higher levels of microbial diversity and abundance found in clay soils in areas of high fire frequencies. Trees from clay soils and low fire frequency areas had enriched $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$. Although not conclusive, the depleted values of $\delta^{15}N$ observed in *B. boehmii* might indicate that root-nodule symbiosis with rhizobia bacteria, and thus symbiotic nitrogen fixation, is active. Both $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ showed adequate potential to discriminate Miombo species, confirming their usefulness to study plant physiological mechanisms and nutrient cycles in terrestrial ecosystems.

Keywords: carbon, metagenomic, microbiome, nitrogen, rhizosphere, stable isotopes.

CAPÍTULO I

1. Introdução geral

1.1. Miombo e sua importância

As savanas africanas constituem uma grande parte do continente africano e são relativamente pouco estudadas em comparação com outros ecossistemas (Chidumayo 1987; Campbell et al. 2007; Ribeiro et al. 2015). O Miombo representa o maior bloco contínuo de floresta tropical seca do mundo (Campbell et al. 2007; Timberlake & Chidumayo 2011; Jimu et al. 2017), cuja dinâmica é fortemente determinada pela componente lenhosa, predominantemente por leguminosas arbóreas (Fabaceae: Caesalpinioideae) pertencentes aos géneros *Brachystegia, Julbernardia* e *Isoberlinia* (Mwakalukwa et al. 2014; Ribeiro et al. 2015; Ribeiro-Barros et al. 2018). Este tipo de floresta contém ainda uma grande diversidade de outras espécies lenhosas subdominantes como *Pseudolachnostylis maprouneifolia* Pax., *Burkea africana* Hook. e *Diplorhynchus condylocarpon* (Müll.Arg.) Pichon (Frost 1996; Chirwa et al. 2008; Ribeiro et al. 2015).

O Miombo cobre dois terços da África Austral, com uma área de cerca de 2,7 milhões de km^2 distribuídos por sete países: Angola, República Democrática do Congo, Malawi, Moçambique, Zâmbia, Tanzânia e Zimbabwe (Fig. 1.1) (Chidumayo 1987; Frost 1996; Ribeiro & Ribeiro 2008; Ryan et al. 2011a; Ribeiro et al. 2015; Jew et al. 2016). Este ecossistema está entre as cinco ecorregiões de endemismo único (Mittermeier et al. 2003; Dewees et al. 2010), contendo mais de 8500 espécies de plantas, 50% das quais endémicas, que suportam vários serviços de ecossistema de grande valor económico, social e ambiental (Ribeiro et al. 2013, 2015; Lupala et al. 2014; Jew et al. 2016). Estes serviços incluem a agricultura, exploração e comercialização de produtos florestais madeireiros e não madeireiros como, lenha e carvão, produtos alimentares e medicinais vitais para a subsistência de milhões de pessoas que vivem em zonas rurais e urbanas (Campbell et al. 2007; Chirwa et al. 2008; Chidumayo & Gumbo 2010; Ribeiro et al. 2015). Do ponto de vista ambiental o Miombo é determinante para o balanço de energia, carbono e água, possuindo um potencial considerável para programas de Pagamento por

Serviços de Ecossistemas (PES) e Redução de Emissões do Desmatamento e Degradação Florestal (REDD+) (Chidumayo & Gumbo 2010; Ryan et al. 2014), bem como para a regulação do clima, sendo responsável pelo sequestro de cerca de 15% de emissões de gases com efeito deestufa, cujos níveis actuais estimam-se em 43.1 $GtCO_2$ (Burck et al. 2019).

A dinâmica ecológica do Miombo é fortemente influenciada pela combinação de factores climáticos (ex. períodos de seca prolongados e temperaturas elevadas), actividades antropogénicas (ex. agricultura, produção de mel e madeira) e acção animal (herbivoria) (Ribeiro et al. 2008b, 2013; Moura et al. 2018). O fogo é um dos factores que mais condiciona a estrutura e a composição da vegetação sendo ao mesmo tempo um dos factores ecológicos chave para a manutenção da estrutura fitossociológica da flora (Chidumayo 1987). Neste sentido, a compreensão das interacções entre o fogo e a vegetação do Miombo é fundamental para criar medidas estratégicas eficazes para a manutenção, conservação e gestão de recursos (Ribeiro et al. 2008b).

1.2. Distribuição e ecologia da floresta de Miombo em Moçambique

Moçambique possui uma superfície total de 799 380 km^2 sendo que 70% é ocupada pela floresta de Miombo que se estende desde o rio Rovuma até ao rio Save (Fig. 1.2) (Marzoli 2007; Ribeiro et al. 2008b; Tipper & Garret 2008). A sua estrutura e composição distingue-se de uma região para outra através da precipitação e do tipo de solo (Ribeiro et al. 2008b). O Miombo húmido ocorre a norte do país com precipitação superior a 1000 mm/ano, temperaturas médias de 26ºC, solos ricos em nutrientes e uma diversidade elevada de espécies tais como *Brachystegia floribunda* Benth., *Brachystegia glaberrima* R. E. Fries., *Brachystegia longifolia* Benth., *Brachystegia wangermeeana* De Wild., *Marquesia macroura* Gilg., *Julbernardia Paniculata* (Benth) Troupin. e *Isoberlinia angolensis* (Welw. ex Benth.) Hoyle & Brenan. (Ribeiro et al. 2002, 2015; Ryan et al. 2011b). O Miombo seco ocorre na região centro, com uma precipitação média anual de 800 mm, temperaturas médias de 32ºC, solos pobres e com baixo teor de carbono. A vegetação é floristicamente pobre, tendo como espécies dominantes *Brachystegia spiciformis* Benth., *Brachystegia boehmii* e *Julbernardia globiflora* (Benth.) Troupin. (Ribeiro et al. 2002, 2008b, 2015; Ryan et al. 2011b).

A ecologia do Miombo é fortemente afectada pela presença de elefantes e pela ocorrência de fogo (Ribeiro et al. 2008b). Ao derrubarem árvores adultas, os elefantes contribuem para o aumento da área coberta por classes de vegetação florestal de pequeno porte, bem como de gramíneas. Por outro lado, o fogo é usualmente usado como instrumento de maneio na época seca, para o rejuvenescimento das pastagens e limpeza de áreas para cultivo, bem como para a produção de carvão, produção de mel e caça (Zolho 2005; Ribeiro et al. 2008b, 2013; Ryan & Williams 2011). Nas regiões centro e norte de Moçambique existe maior incidência de fogos, estimando-se que 40% das áreas florestais queimam anualmente (Zolho 2005; Ribeiro et al. 2008b).

A maior parte dos estudos sobre a resposta do ecossistema do Miombo em relação às alterações da cobertura do solo, fogo e distúrbios associados, vem sendo levada a cabo na Reserva Nacional do Niassa (RNN; *e.g.* Ribeiro et al. 2008b, 2008a, 2011, 2013, 2015; 2017; Maquia et al. 2013; Mbanze et al 2019a, 2019b). Esta reserva constitui uma das áreas menos perturbadas das florestas de Miombo africanas, sendo por isso considerada uma das maiores e mais importantes áreas de conservação de Miombo do mundo (Campbell et al. 2007). Os trabalhos integraram dados de detecção remota e de campo para investigar as alterações na dinâmica da vegetação em resposta ao clima, movimentos e densidade humana, fogos antropogénicos e herbivoria por elefantes. Os resultados indicam a existência de um gradiente de incêndios cuja frequência aumenta de Oeste para Este, fortemente associado à densidade populacional e ao clima (temperatura e precipitação) (Ribeiro et al. 2008a). Ao nível da vegetação, observaram-se alterações na estrutura e composição na zona Este da reserva, onde o número de indivíduos jovens de espécies típicas de Miombo, como *J. globiflora* e *Brachystegia* spp., decresceu e espécies sub-dominantes como *Combretum* spp. e *Terminalia sericea* Burch. Ex. DC, tendencialmente poderão passar à categoria dominante (Ribeiro et al. 2008b). No entanto, a vegetação de Miombo na RNN continua a ser uma das mais representativas e intactas da ecorregião (Ribeiro et al. 2013; 2017). Em linha com estas observações, Maquia et al. (2013), verificou que a diversidade genética tende a ser mais elevada em espécies tolerantes ao fogo, como é o caso de *Burkea africana* (subdominante), observando-se um efeito de piro diversidade em *B. boehmii*, a espécie dominante na RNN,

susceptível ao fogo. Na vertente da dinâmica do carbono, um estudo de base conduzido por Ribeiro et al. (2013; 2015) identificou a RNN como um repositório considerável de carbono e biomassa, em particular no solo e na vegetação arbórea, evidenciando o potencial da reserva para programas REDD+ e PES.

Outro foco crescente de investigação em Moçambique é o Parque Nacional da Gorongosa (PNG), tal como referido acima um dos repositórios de biodiversidade reconhecido a nível internacional (Wilson 2004), que representa o segundo mosaico de floresta de Miombo mais importante do país. Embora a investigação em Miombo seja escassa e incipiente, os estudos existentes indicam que a dinâmica do fogo, da vegetação e do carbono seguem a mesma tendência do que na RNN, salientando a importância da integração dos serviços de ecossistema nos programas de conservação (Zolho 2005; Ryan 2007; Ryan & Williams 2011b).

1.3. Microbioma do solo

O solo compreende uma grande diversidade de características físico-químicas e microbiológicas, estas últimas representando o maior repertório genético do planeta do qual apenas uma pequena fracção é conhecida (Rodrigues 2011; Řeháková et al. 2015; Júnior 2017; Jansson & Hofmockel 2018; Compant et al. 2019; Dube et al. 2019). Os microrganismos são responsáveis por diversos serviços ambientais, desempenhando um papel importante na reciclagem de nutrientes, mediando os vários ciclos biogeoquímicos, e na mitigação de mudanças climáticas através da fixação e imobilização de gases (Viana et al. 2011; Nkuekam et al. 2018). Diversos factores podem afectar o microbioma do solo, incluindo a vegetação, o tipo de solo e distúrbios antropogénicos como o fogo (Viana et al. 2011; Lira 2012; Whitman et al. 2019).

Vários estudos revelam que um grama de solo pode conter aproximadamente 1 milhão de microrganismos e até 10 000 espécies diferentes, cuja complexidade e funcionalidade são reguladas pela interacção de vários factores bióticos e abióticos, como pH, água, clima, fogo (Pinho 2012; Júnior 2017; Serrano-Silva & Calderón-Ezquerro 2018; Dube et al. 2019). Apesar da grande diversidade, a microflora do solo é dominada por quatro filos principais (*Actinobacteria,*

Bacteroidetes, Firmicutes e *Proteobacteria*) com funções de fixação de nitrogénio, degradação de substâncias e promoção de crescimento vegetal, entre outras (Kitano 2002; Rascovan et al. 2013; Numan et al. 2018; Rilling et al. 2019).

Com objectivo de garantir a conservação de populações naturais e de assegurar a sua viabilidade a longo-prazo em bancos genéticos, as actividades de levantamento, colheita, caracterização e conservação de espécies são o caminho mais directo para a conservação da biodiversidade (Dewees et al. 2010; Jew et al. 2019) e a presença de microrganismos nos solos poderá construir um bom modelo de heterogeneidade espacial (Dewees et al. 2010; Castro 2015; Jaiswal et al. 2017; Wolińska et al. 2017; Chidumayo 2019). Por outro lado, a importância de microrganismos na rizosfera é um tema central na ecologia microbiana. Contudo, o conhecimento sobre o microbioma de solos é um tópico emergente ao nível global e praticamente nulo nos ecossistemas africanos, onde o reconhecido potencial biotecnológico da macro e microflora nativa está pouco explorado (Rughöft et al. 2016; Teixeira & Rodríguez-Echeverría 2016). Estima-se que os solos de Miombo apresentem uma grande diversidade microbiana, uma vez que as espécies típicas são leguminosa arbóreas, multifuncionais e resilientes a condições ambientais extremas, como acidez, as temperaturas altas e a baixa disponibilidade de nutrientes (Rughöft et al. 2016; Moura et al. 2018; Ribeiro-Barros et al. 2018; Maquia et al. 2019). Teixeira & Rodríguez-Echeverría (2016) efectuaram a caracterização de bactérias fixadoras de nitrogénio em três leguminosas arbóreas, *Acacia xanthophloea, Faidherbia albida* e *Albizia versicolor*, no Parque Nacional da Gorongosa. Neste estudo foi possível concluir que existe uma clara delimitação entre os microsimbiontes de (i) *A. Xanthophloea* e de (ii) *F. albida* e *A. versicolor*, observando-se uma maior diversidade de géneros no primeiro caso, onde foram identificadas bactérias pertencentes a três géneros (*Mesorhizobium, Rhizobium* e *Ensifer*), do que nas últimas duas espécies, onde apenas foram identificadas bactérias do género *Bradyrhizobium*.

Outro estudo foi realizado por Rughöft et al. (2016) no Parque Nacional de Kruger (África do Sul), sobre a caracterização e abundância de bactérias nitrificantes em solos. Deste estudo foi possível identificar 979 espécies de bactérias das quais os filos mais abundantes foram

Actinobacteria, Cloroflexi e *Firmicutes* associados à fixação e conversão de nitrogénio. Os resultados sugerem que existe uma forte relação entre a escassez de nutrientes no solo e as comunidades microbianas, resultando na clara distinção na estrutura da comunidade microbiana.

1.4. Metagenómica

Embora as técnicas de cultivo de microrganismos tenham sido aperfeiçoadas nos últimos anos, o conhecimento da ecologia microbiana ainda é insuficiente para desvendar o microbioma total no solo (Handelsman 2005). A metagenómica é um campo emergente, constituindo uma abordagem de análise alargada e simultânea de várias espécies de microrganismos a partir do DNA isolado directamente da amostra ambiental e sem a necessidade de cultivo prévio dos microrganismos (Ghanzafar et al. 2010; Ghosh et al. 2018; Molina-Montenegro et al. 2018). A metagenómica foi desenvolvida com o intuito de auxiliar os métodos de microbiologia clássica a entender melhor a diversidade de microrganismos nos mais variados ambientes, uma vez que há evidências de que a grande maioria dos microrganismos presentes na Terra não são cultiváveis (Schloss & Handelsman 2005; Meneghine 2016).

A metagenómica tem uma ampla gama de aplicações desde clínicas e ambientais, a segurança alimentar e tratamento de resíduos industriais (Aw et al. 2016). As informações obtidas através da análise metagenómica podem ser usadas para determinar a diversidade de organismos em amostras ambientais, a presença de microrganismos específicos, rotas metabólicas e redes génicas (Rodrigues 2011). Através da metagenómica têm sido descobertas novas espécies e biomoléculas e aprofundado o conhecimento de diversas interacções microbiológicas em vários ambientes (Carbonetto et al. 2014; Meneghine 2016). Por exemplo, a metagenómica tem sido utilizada para identificar vários biocatalisadores, como por exemplo lacasses, esteirasses e hidratasses de nitrila (Aw et al. 2016) ou bioremediadores de ambientes poluídos (Fang et al. 2010; Fernández-Arrojo et al. 2010).

Os avanços científicos nas áreas de biologia molecular, bioinformática e sequenciamento de nova geração (NGS) tornaram possível obter informações detalhadas e completas que explicam

fenómenos biológicos não apenas pela identificação de componentes funcionais, mas essencialmente pela integração de processos biológicos desde o gene ao ecossistema (Fig. 1.3; Gutiérrez et al. 2005; Coruzzi et al. 2009). A tecnologia de NGS baseia-se no sequenciamento massivo de genes em plataformas capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases a um custo moderado e em pouco tempo (Caporaso et al. 2012; Dudhagara et al. 2015). Um exemplo é a aplicação da técnica de NGS para a sequenciação dos genes codificadores de RNA ribossómico 16S (16SrRNA) e 18S (18SrRNA) ou do espaçador interno transcrito (ITS) para o estudo de população de bactérias e fungos, respectivamente (Coruzzi et al. 2009). Através desse tipo de abordagem, tem sido possível revolucionar o campo da ecologia microbiana e investigar posições e relações filogenéticas e funcionais em ecossistemas naturais (Handelsman 2005; Pereira et al. 2008; Wei et al. 2018).

Vários estudos (*e.g.* Handelsman 2005; Pereira et al. 2008; Taş et al. 2014; Tsurumaru et al. 2015), mostraram que as comunidades microbianas são influenciadas por factores ambientais como solo, fogo e vegetação e que de um modo geral, desempenham um papel ecológico da maior relevância, sendo responsáveis por processos que promovem a tolerância a stresses bióticos e abióticos e o crescimento vegetal, como a fixação de nitrogénio, produção de fitohormonas ou solubilização de fosfato.

1.5. Ecologia isotópica

A composição isotópica de elementos como o carbono, hidrogénio, nitrogénio e oxigénio em plantas varia em função do ambiente (Almeida & Vasconcelos 2004; Pereira & Benedito 2007). Ao nível do ecossistema esta composição é vista como uma forma de entender os processos fisiológicos e ecológicos associados aos ciclos biogeoquímicos (Dawson et al. 2002; Aranibar et al. 2003). De um modo geral, pode-se dizer que os isótopos estáveis são isótopos que não se deterioram ou alteram ao longo do tempo, já que a sua massa é estável (Coletta et al. 2009; Fry 2010). O isótopo estável menos abundante (menos comum na natureza) de um elemento tem menos um ou dois neutrões do que protões, o que tem como consequência um aumento da massa e, portanto, são formas moleculares mais pesadas do que o correspondente isótopo estável mais comum para os mesmos elementos (Leavitt & Long 1986; Domingues & Berry

2006; Baeta 2018). Devido a este facto, a taxa de reacção durante as reacções físicas, químicas e biológicas são diferentes e condicionam o fraccionamento isotópico daí decorrente (Adams & Grierson 2001; Dawson et al. 2002; Pereira & Benedito 2007). As análises das abundâncias naturais (normalmente determinadas através da espectrofotometria de massa de razão isotópica - IRMS) relativas de isótopos têm sido usadas para interpretar processos ao nível das comunidades e ecossistemas e contribuído para a compreensão das interacções entre a biosfera e a atmosfera (Adams & Grierson 2001; Craine et al. 2015). Existem dois isótopos estáveis de nitrogénio na natureza (^{14}N e ^{15}N), cuja média natural da abundância no ar é 99.6% e 0.4% para ^{14}N e ^{5}N, respectivamente (Hogberg 1997). Os valores naturais de N variam de -20 a 20 por mil (‰) (Zengeni & Kakembo 2017). As plantas leguminosas geralmente apresentam valores menores de $\delta^{15}N$ em relação às não leguminosas (Guehl et al. 1998; Mardegan 2007). O nitrogénio presente no solo tende a ser mais rico em isótopo ^{15}N comparado aos tecidos vegetais devido à presença de microrganismos simbióticos (Zengeni & Kakembo 2017). Durante o processo de decomposição das plantas no solo, a assinatura isotópica das plantas leguminosas que fixam nitrogénio tende a ficar próxima de zero e desta forma o $\delta^{15}N$ pode ser usado para identificar a origem de nitrogénio na planta (Guehl et al. 1998; Adams & Grierson 2001; Ometto et al. 2006; Mardegan 2007).

Igualmente o carbono apresenta dois isótopos, ^{12}C e ^{13}C. Os principais processos de fraccionamento isotópico de carbono na planta ocorrem durante a difusão de dióxido de carbono através dos estomas durante a fotossíntese, afectando assim a composição isotópica de carbono nos tecidos vegetais e ao longo da cadeia trófica (Guehl et al. 1998; Brugnoli 2000; Adams & Grierson 2001). Em particular nas plantas com um sistema fotossintético em C3 (como é o caso da maioria das árvores de Miombo), o $\delta^{13}C$ reflecte as respostas ao stresse ambiental que condicionam a abertura e fecho estomático (Máguas & Griffiths 2003; Rodrigues et al. 2009; Werner & Máguas 2010). De um modo geral, o maior fraccionamento isotópico observado na natureza em relação ao $\delta^{13}C$ está associado à actividade carboxilativa da ribulose 1,5- bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO), o que faz com que toda a produtividade primária seja muito empobrecida no isótopo mais pesado (Máguas & Griffiths 2003; Rodrigues et al. 2009). No entanto, em condições de seca ou após um fogo, uma resposta fisiológica

baseada no fecho estomático tem como consequência o decréscimo da pressão interna de dióxido de carbono ao nível da RUBISCO, e um enriquecimento do isótopo mais pesado (^{13}C) na matéria orgânica resultante (Yoneyama et al. 1993; Guehl et al. 1998; Brugnoli 2000). Deste modo é possível determinar a eficiência do uso de água (WUE) através da variação da composição isotópica foliar, o que permite o seu uso para investigar e rastrear as respostas das plantas às variações climáticas em diferentes áreas geográficas (Rodrigues et al. 2009). A relação de carbono e nitrogénio (C/N), bem como o fraccionamento isotópico ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) são uma ferramenta útil para estudos sobre o ciclo de C e N ao nível dos ecossistemas, devido ao seu valor integrador em processos chave como a relação entre os solos e as plantas (Chikaraishi et al. 2011; Bustamante et al. 2004).

A fixação biológica de nitrogénio (FBN) é restrita aos procariotas e constitui a fonte principal de entrada de nitrogénio nos ecossistemas terrestres. Apesar das leguminosas arbóreas representarem uma das mais diversas e abundantes famílias de plantas do ecossistema de Miombo (Ribeiro-Barros et al. 2018; Maquia et al. 2019), pouco se sabe sobre a sua capacidade de estabelecer relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogénio (rizóbio) (Maquia et al. 2019). A utilização de isótopos estáveis constitui uma abordagem apropriada para avaliar a actividade simbiótica e rastrear a importância deste processo ao nível do ecossistema (Robinson et al. 2000; Nardoto 2005; Rascher et al. 2012; Perkins et al. 2014; Nowak & Koegler 2018). Como referido acima um dos factores mais importantes para a estrutura e funcionamento da vegetação de Miombo e que está claramente associado à presença humana é o fogo (Redin et al. 2011), que nas últimas décadas tem-se tornando mais intenso em áreas protegidas (Zolho 2005; Ribeiro et al. 2008b). Este facto influência fortemente os fluxos de N em ecossistemas de savana uma vez que o fogo consome a camada superficial do solo, expondo a matéria orgânica e aumentando a disponibilidade temporária de nutrientes como nitrogénio e fósforo (Bustamante et al. 2004; Coletta et al. 2009). Assim, o uso de isótopos estáveis de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ nesse ecossistema pode indicar como é feita a regulação dos ciclos de N e C, com base na resposta das plantas ao fogo e aos nutrientes presentes no solo (Swap et al. 2004; Aranibar et al. 2010). Embora exista uma enorme preocupação dos ecólogos em entender as relações existentes entre o fogo e o Miombo, o número de estudos que integram a

determinação da composição isotópica foliar de diferentes espécies de Miombo como indicador das respostas fisiológicas e ecológicas às alterações do meio são raros. Alguns desses raros estudos, revelaram uma variação de $\delta^{13}C$ em plantas leguminosas lenhosas entre -40 e -20 ‰ (Yoneyama et al. 1993; Zengeni & Kakembo 2017), o que está claramente associado a uma grande variação da disponibilidade hídrica de nutrientes, bem como da resposta das plantas a factores abióticos.

Esta dissertação apresenta um estudo multidisciplinar sobre o efeito do tipo de solo e regime de fogo na dinâmica da biodiversidade microbiana da rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* no PNG, aliado à ecologia isotópica do N e C destas duas leguminosas arbóreas de Miombo.

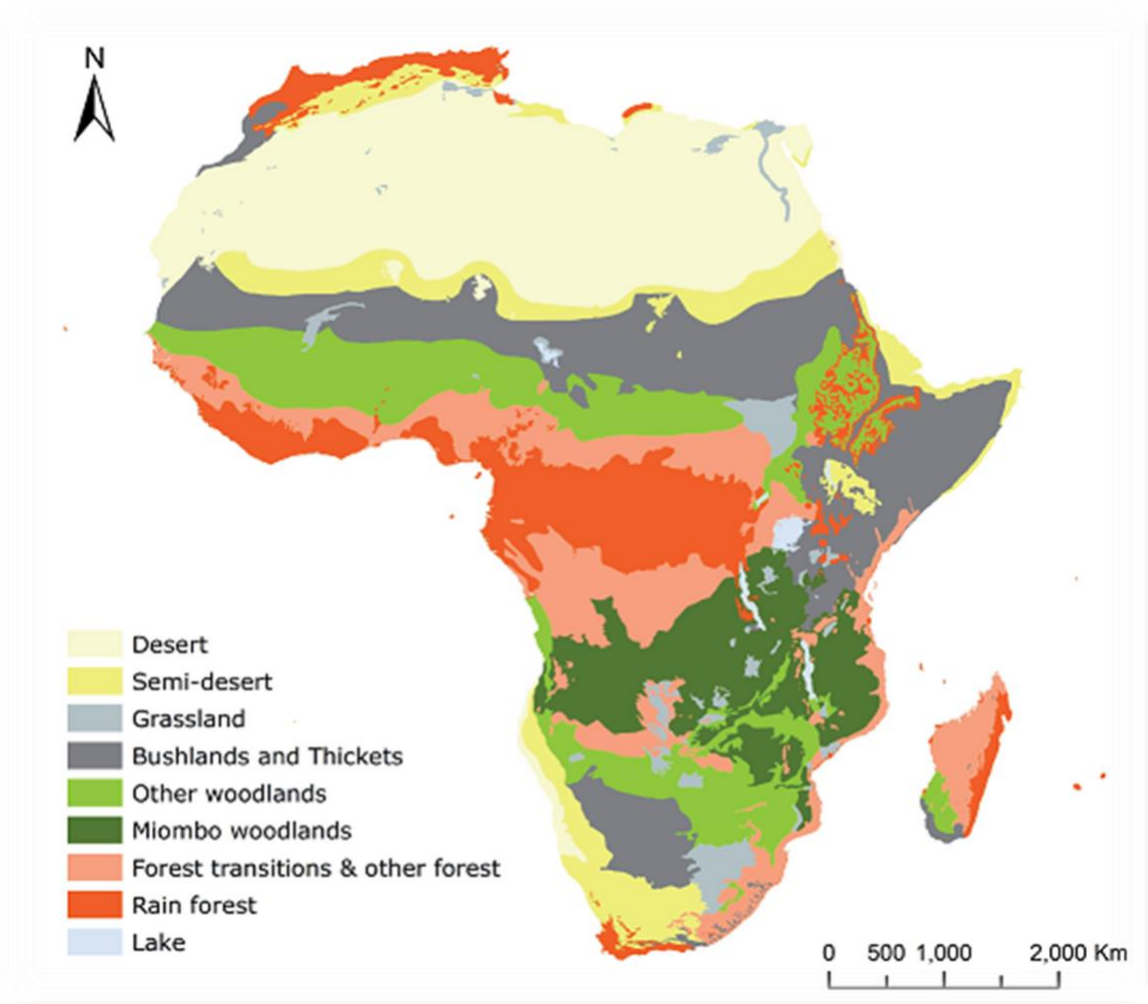

Figura 1.1: Mapa da vegetação de África, mostrando Miombo em verde escuro. Fonte: Ribeiro et al. 2015.

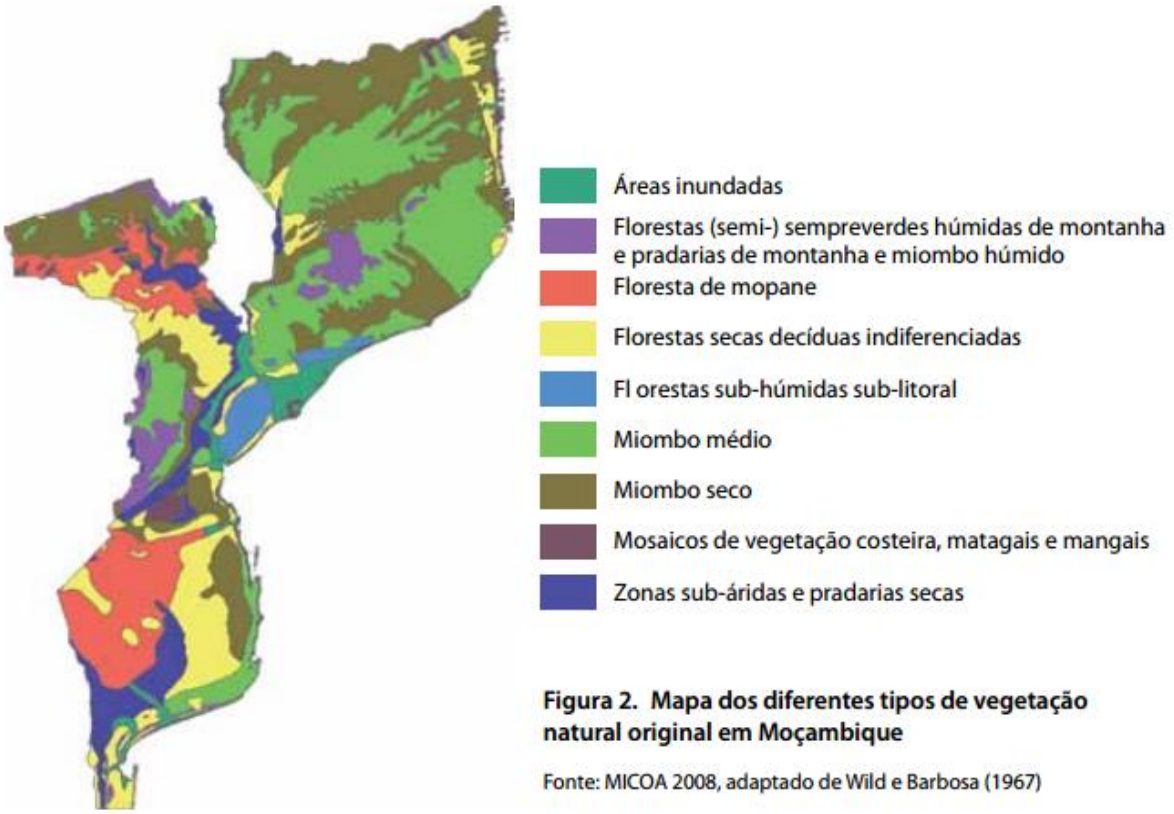

Figura 1.2: Distribuição do Miombo ao longo de Moçambique. Fonte: Marzoli 2007.

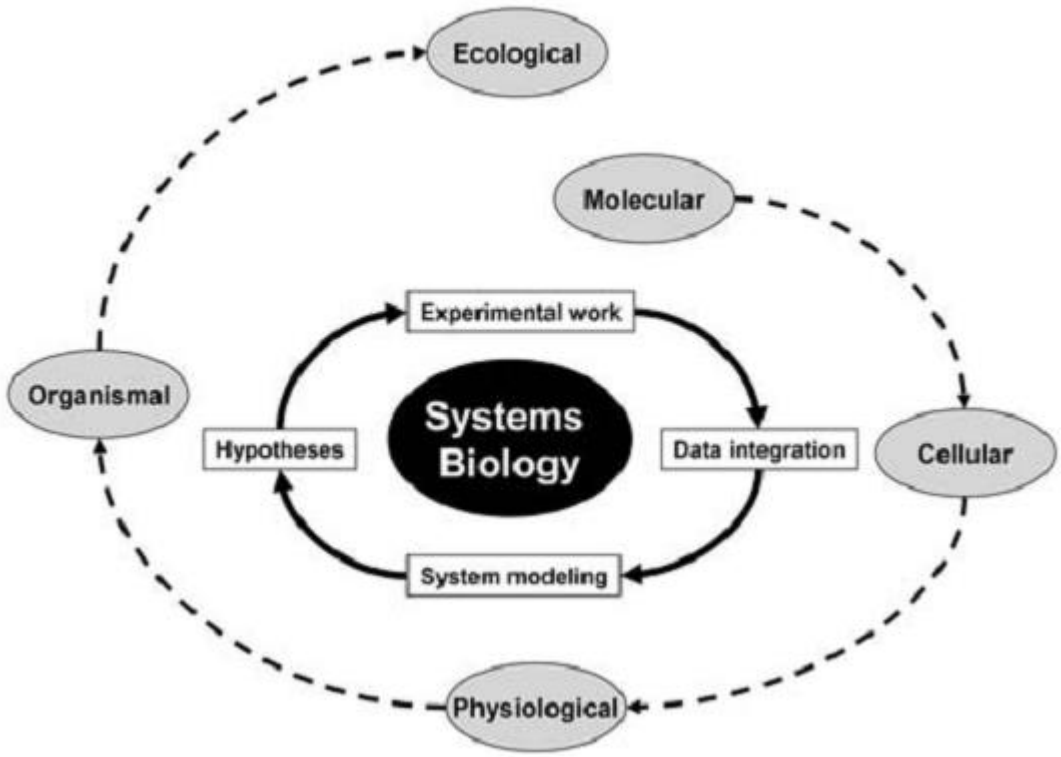

Figura 1.3: Esquema de integração da biologia de sistemas com outros campos da biologia (molecular, celular, fisiológica, organizacional e ecológica). Fonte: Guiterrez et al. 2005.

CAPÍTULO II

2. Metagenómica de solos e ecologia isotópica

2.1. Introdução

A floresta de Miombo é a ecorregião mais extensa da África Austral, cobrindo cerca de 2.7 milhões de km^2 da região Sudano-Zambeziana em sete países, Angola, Malawi, Moçambique, República Democrática do Congo, Tanzânia, Zâmbia e Zimbabwe, e albergando uma vasta diversidade biológica (Campbell et al. 2007; Chidumayo & Gumbo 2010; Ryan et al. 2011a; Lupala et al. 2015; Ribeiro et al. 2019). A vegetação é dominada por leguminosas arbóreas pertencentes aos géneros *Brachystegia, Julbernardia* e *Isoberlini*a (Frost 1996; Campbell et al. 2007).

Em Moçambique, o Miombo ocupa cerca de dois terços do território nacional (Fig. 1.2) e suporta mais de 100 000 formas de vida, fornecendo uma vasta gama de serviços de ecossistema de relevância socioeconómica (*e.g.* alimentação humana e animal, cuidados de saúde primários, habitação, produção de madeira e lenha) e ambiental (*e.g*. balanço de carbono, água e energia; Frost 1996; Ribeiro et al. 2013; Moura et al. 2018). No entanto, a dinâmica do Miombo é fortemente influenciada pela acção climática (*e.g.* períodos secos cada vez mais prolongados e com temperaturas elevadas) (Mapaure & Moe 2009; Ribeiro et al. 2015; Jew et al. 2016) e acção humana (*e.g*. agricultura itinerante, mineração e produção de mel, madeira e lenha) (Malmer 2007; Isabel 2015; Jew et al. 2016), que no seu conjunto impõem uma série de pressões no ecossistema.

O fogo é um dos factores que mais condicionam a estabilidade e a dinâmica desta ecorregião (Frost & Robertson 1985; Ometto et al. 2006; Coletta et al. 2009). Desde há vários séculos, que as populações humanas usam o fogo como prática de gestão para a agricultura, caça e produção de mel. Deste modo, estes ecossistemas estão sendo afectados por fogos com origem antropogénica (Malmer 2007; Ryan et al. 2011a). Por outro lado o fogo é um agente biogeoquímico que influencia o ciclo de nutrientes através da mineralização dos solos, aumentando a disponibilidade de nutrientes para o crescimento de plantas, devido às cinzas

com alta concentração de fósforo, potássio e cálcio (Frost & Robertson 1985; Certini 2005; Mataix-Solera et al. 2009). A intensidade e a frequência do fogo têm um papel chave na dinâmica e composição da estrutura florestal e do respectivo microbioma (Raison 1979; Pereira et al. 2018). Assim, se por um lado o fogo é crucial para equilibrar a estrutura e a composição da vegetação do Miombo, por outro, a ocorrência excessiva impõe alterações que comprometem a estabilidade do ecossistema (Mapaure & Moe 2009; Isabel 2015).

Os microrganismos do solo representam as formas de vida mais abundantes na natureza e representam a maior diversidade genética estimada (Lambais et al. 2005). O microbioma do solo é responsável pelos ciclos biogeoquímicos, transformação e reciclagem de matéria orgânica, fixação de nitrogénio e degradação de compostos inorgânicos (Barcellos 2001). Tem um papel chave na manutenção da qualidade do solo, uma vez que desempenha diferentes funções podendo ser usado como bioindicador de qualidade (Rodrigues 2011; Ramos et al. 2018). A rizosfera de espécies florestais é rica em microrganismos promotores de crescimento de plantas, designadamente fungos e bactérias (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria)* que possuem um potencial enorme na agricultura, medicina e ambiente (Ghanzafar et al. 2010). Estima-se que num grama de solo florestal existam cerca de $4x10^7$ células procarióticas (Daniel 2005; Kaur et al. 2018), determinantes para a produção de matéria orgânica e disponibilização de nutrientes e protecção de plantas contra factores bióticos e abióticos, bem como para as propriedades físicas do solo (Tobin & Janzen 2008; Rodrigues 2011). Devido à sua significância, estudos sobre este tipo de microrganismos têm vindo a crescer exponencialmente com vista a aplicações de interesse biotecnológico (Pereira et al. 2008). No entanto, a diversidade microbiana global da rizosfera está pouco estudada, particularmente na ecorregião de Miombo, onde raros estudos têm vindo a ser realizados e as interacções planta-microrganismo, nomeadamente a simbiose entre leguminosas arbóreas e bactérias fixadoras de nitrogénio (FSN), estão por elucidar (Teixeira & Rodríguez-Echeverría 2016; Ribeiro-Barros et al. 2018; Maquia et al. 2019). Tendo em conta que a fixação biológica de nitrogénio (FBN) é um processo exclusivo dos procariotas e constitui a maior via de entrada do nitrogénio nos ecossistemas, desempenhando um papel fundamental na fertilidade dos solos (Chaer et al. 2011; Kurdali & Al-

shamma 2015), a análise dos processos de FSN são de extrema importância para compreender o funcionamento do Miombo.

Ao nível da vegetação, o carbono (C) e o nitrogénio (N) são considerados elementos chave para o crescimento e produtividade das plantas (Nowak & Koegler 2018; Ribeiro-Barros et al. 2018). A dinâmica destes dois elementos é influenciada por processos bioquímicos e fisiológicos, principalmente através da fotossíntese, que é um elo de ligação entre a atmosfera e os ecossistemas terrestres, e da absorção e assimilação de nutrientes (Coletta et al. 2009). A fotossíntese é a principal forma de fixação de carbono atmosférico nas plantas (Voronin et al. 2017) e o dióxido de carbono representa a principal ligação entre o ciclo do carbono orgânico e inorgânico (Brugnoli 2000). Por sua vez, o nitrogénio é assimilado pelas plantas por via radicular, sendo um dos elementos mais limitantes no solo, pelo que as associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogénio oferecem à planta uma vantagem competitiva (Chaer et al. 2011; Craine et al. 2015). A análise da composição isotópica estável ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) é uma técnica valiosa no estudo de como as plantas interagem com o seu meio ambiente. Estas análises são uma ferramenta útil para avaliar o balanço de C e N em plantas, facto particularmente relevante em áreas sujeitas a pressões ambientais (como o stresse hídrico, térmico ou salino, Duro et al. 2016).

O presente estudo visa alargar os trabalhos de investigação sobre a dinâmica do fogo e da biodiversidade na floresta de Miombo, através da caracterização do microbioma do solo, baseada na sequenciação do gene ribossomal *16S rDNA*, e da ecologia de isótopos estáveis (N e C) em duas espécies típicas deste ecossistema: *Brachystegia spiciformis* Benth. e *Brachystegia boehmii* Taub. no Parque Nacional da Gorongosa e respectiva zona tampão. O estudo decorreu em parcelas demarcadas em áreas com diferentes históricos de fogo (elevada e baixa frequência) (Ryan 2009), tendo ainda em conta o tipo de solo. Com este trabalho, pretende-se ter uma melhor compreensão do efeito destes três factores na diversidade microbiana e reciclagem de nutrientes na floresta de Miombo.

2.2. Metodologia

2.2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na área de Nhambita (-18.999826 S, 34.202034 E) que está localizada no sul do distrito da Gorongosa, na província de Sofala, centro de Moçambique (Fig. 2.1). A área está parcialmente dentro do Parque Nacional da Gorongosa (PNG), descrito como um dos locais mais biodiversos do Mundo (Wilson 2004). A área de estudo apresenta um clima tropical com verão húmido e inverno seco e uma precipitação média anual que varia de 600 a 875 mm (Tinley 1977). Geologicamente os solos consistem em superfícies erodidas de granito e complexos basálticos, produzindo solos arenosos e argilosos (Tinley 1977; Zolho 2005). Nos solos arenosos as termiteiras (*Macrotermes*) formam áreas com solos enriquecidos em nutrientes e melhor retenção de água, ocorrendo em densidade de pelo menos um por hectare. (Stalmans & Brilfudd 2008). A vegetação é predominantemente de floresta seca de Miombo, intercalada com arbustos sempre-verdes nas areias aluviais mais profundas. As espécies dominantes são *Brachystegia spiciformis*, *Brachystegia boehmii* e *Julbernardia globiflora* (Benth.) (Ryan et al. 2011a; Daskin et al. 2016). O PNG possui uma área de 3770 km^2, com uma co-gestão entre o Governo de Moçambique e a Fundação Carr (Stalmans & Brilfudd 2008; Stalmans et al. 2019), constituindo umas das áreas menos exploradas da grande fenda africana que constitui o Vale do Rift, considerado o berço da humanidade (Pickford 2012; Habermann et al. 2019).

2.2.2. Amostragem

As amostras de solo e folhas foram colectadas entre Agosto e Setembro de 2018, no final da época de seca, em quatro parcelas de um hectare previamente estabelecidas (Ryan 2009), duas em zonas de elevada frequência de fogo (fogos anuais) e duas em zonas de baixa frequência de fogo (último fogo há mais de 6 anos) de acordo com os dados oferecidos pelos MODIS FIRE (Ryan 2009). Em cada parcela foram colhidas amostras de folhas de cinco indivíduos de *B. boehmii* e *B. spiciformis* distanciados a 10 m um do outro (Tabela 2.1). Foram retiradas duas a quatro folhas maduras e sadias na copa de cada indivíduo adulto que foram acondicionadas em

sacos de plástico, transportadas em gelo para o laboratório e imediatamente desidratadas em estufa durante 48 h a 60ºC para a análise isotópica. As amostras de solo (arenoso e argiloso) foram retiradas da rizosfera de cada um dos cinco indivíduos de cada espécie a uma distância de 10 cm do tronco da árvore, com uma sonda (*AMS 401.01*) a 20-30 cm de profundidade. As amostras foram devidamente acondicionadas em sacos de plástico, colocadas numa caixa térmica com gelo e transportadas até ao laboratório onde ficaram armazenadas a -80ºC até à extracção de DNA.

2.2.3. Extracção de DNA genómico, quantificação e determinação de grau de pureza e integridade e amplificação

O DNA genómico de microorganismos foi extraído a partir de 0,25-0,30 g de solo utilizando o kit *DNeasy PowerSoil®* (QIAGEN; Maryland, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do DNA genómico foi efectuada por leitura espectrofotométrica (*Nanodrop ND-1000*; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos da América) às densidades ópticas (D.O.) de 260, 230 e 280 nm. Uma vez que $D.O._{260}$ = 1 equivale a 50 ng DNA/μL, a quantidade de DNA na amostra foi calculada multiplicando a $D.O._{260}$ da amostra por 50. As razões $D.O._{260}/D.O._{230}$ e $D.O._{260}/D.O._{280}$ foram usadas para calcular o grau de contaminação com polissacarídeos e proteínas, respectivamente, considerando-se puras as amostras com razões superiores a 1,8. A avaliação da integridade do DNA genómico, bem como a confirmação da sua concentração e do seu grau de pureza, foram efectuados por electroforese em gel de agarose a 1 % corado com GelRed (GeneOn; Ludwigshafen, Alemanha) em tampão TAE 1X (400mM Tris-acetato e 10nm EDTA). Após electroforese o DNA foi visualizado colocando o gel sobre uma fonte de luz ultravioleta. A qualidade do DNA genómico foi também reavaliada num bioanalyzer (Modelo 2100; Agilent Technologies; Santa Clara, Estados Unidos da América).

Para analisar a composição bacteriana das amostras, a região V3-V4 do gene 16S RNA foi amplificada por PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, emparelhamento dos *primers* a 53 °C por 40 s, e extensão a 72 °C por 1 min, e uma fase final de

alongamento a 72 °C por 5 min. Foram usados os *primers* específicos para V3/V4 341F (5'-CCT ACG GGG NGG CWG CAG-3') e 805R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') e seus adaptadores nas extremidades 5' e 3' dos fragmentos de DNA (Rognes et al. 2016).

2.2.4. Sequenciação por Illumina MiSeq e análise bioinformática

Os amplicões foram extraídos dos géis de agarose a 2%, purificados usando o kit DNA AxyPrep (Axygen Biosciences; Union City, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificados usando um bioanalyzer (Modelo 2100; Agilent technologies, Santa Clara, Estados Unidos da América). Os amplicões purificados foram reunidos em quantidades equimolares e sequenciados na extremidade emparelhada (2 × 300 pb) na plataforma Illumina MiSeq (Beijing Allwegene Technology, Beijing, China) de acordo com os protocolos padrão. A produção de dados brutos, correspondente a todos os fragmentos sequenciados, foi efectuada através do *software* RTA (*Real Time Analysis*, Illumina, Califórnia, Estados Unidos da América) e do aplicativo FASTQ do programa blc2fastq (Illumina, Califórnia, Estados Unidos da América). Esta análise foi efectuada pela Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

A análise bioinformática dos fragmentos sequenciados foi efectuada com o Freeware Mothur v.1.33. (Schloss et al. 2009). As sequências brutas foram filtradas com base nas seguintes especificações: comprimento mínimo do fragmento de 100 pb, ausência de nucleótidos ambíguos e máximo 10 pb de homopolímeros. As sequências foram alinhadas e agrupadas com base na semelhança de 99% e os *singletons* foram removidos do conjunto de dados.

As potenciais sequências quiméricas foram identificadas de novo e removidas usando o algoritmo QUIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) v.1.9.0 de código aberto (Mandakovic et al. 2018). Em seguida, as sequências únicas foram agrupadas em Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs), com 97% de similaridade, usando a ferramenta VSEARCH v.6.1.544 (Caporaso et al. 2012). Um corte de dissimilaridades de 3% foi usado para distinguir as espécies. OTUs com menos de 200 *reads* foram removidas para remover o risco de falsa riqueza de espécies.

A taxonomia foi atribuída através de uma busca por sequências similares usando um coeficiente de 97% de similaridade e conduzidas com o aplicativo Blast v.2.2.29, contra o lançamento 13_5 do banco de dados on-line do Greengenes (Rognes et al. 2016). Taxas não-alvo pertencentes a eucariotas e Archaea, bem como genomas cloroplastidiais e mitocondriais foram removidos do conjunto de dados.

O programa QUIIME v.1.9.1 foi ainda utilizado para (1) a análise da diversidade bacteriana através do cálculo do índice de diversidade de Shannon (H), Simpson e Chao1 usando o pacote alfa_diversity; (2) obtenção das curvas de rarefacção (riqueza de espécies observadas) para comparação da riqueza de OTUs entre diferentes grupos usando o pacote alfa_rarefaction.py; e (3) a plotagem PCoA (Análise de Coordenadas Principais) usando o pacote make_2Dplots.

A análise funcional foi feita usando o programa MG-Rast v.4.0.3 e baseada na abundância normalizada de correspondências de sequências para o banco de dados (SEED) (Meyer 2013; Wilke et al. 2017). Uma tabela de frequência de acertos para cada função e para cada metagenoma foi gerada e normalizada pelo número total de ocorrências (Dudhagara et al. 2015; Wilke et al. 2017). Para identificar a funcionalidade, o BlastX foi usado com um comprimento mínimo de 50 pb. Gráficos de escala multidimensional e PCoA foram utilizados para visualizar a estrutura entre as amostras, utilizando o critério taxonómico e funcional (Mendes 2014; Wilke et al. 2017). Para detectar o efeito do regime de fogo em função do tipo de solo e espécie foi feita uma análise *Nested* com todas as variáveis e suas interacções. As diferenças de abundância e diversidade da comunidade bacteriana entre o solo argiloso e arenoso foram comparadas pelo teste t de amostra independente. Todos esses testes foram realizados usando o programa STATISTICA v.10.0.

2.2.5. Análise de composição isotópica e análise elementar

As amostras de folhas colhidas e transportadas em gelo para o laboratório foram secas a 60º C durante 48h e moídas num Retsh mil MM2 (Retsh, Haan, Alemanha), duas vezes durante cinco minutos cada, até redução em pó fino. Depois da moagem, 0,5 mg de cada amostra foram pesados em cápsulas de estanho para a análise isotópica ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$).E percentagem de C e N.

A análise da relação isotópica estável foi realizada no Centro de Recursos em Isótopos Estáveis (Instalação de Análises Estáveis e Análise Instrumental, na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal) por espectrometria de massa de isótopos de fluxo contínuo (CF-IRMS, Haan, Alemanha) num espectrómetro de massa de razão isotópica estável (Hydra 20-22, Sercon, Reino Unido), acoplado a um analisador elementar (EuroVector, Pavia, Itália) por combustão de Dumas. O cálculo da composição isotópica foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\delta = [(\mathbf{R}\text{amostra} - \mathbf{R}\text{padrão}) / \mathbf{R}\text{padrão}] * 1000$$

Onde R é a razão entre o isótopo mais pesado e o isótopo menos pesado. Os valores de $\delta^{15}N$ são referentes ao ar atmosférico e os valores de $\delta^{13}C$ apresentam-se na escala determinada pelo PeeDee Belemnite (PDB). Os materiais de referência utilizados foram USGS-25, USGS-35, BCR-657 e IAEA-CH7 (Coleman & Meier-Augenstein 2014). O padrão laboratorial utilizado foi o da farinha de trigo OAS/Isotope (Microanálise Elementar, Devon, Reino Unido). A incerteza da análise da razão isotópica, calculada usando valores de 6 a 9 réplicas do padrão de laboratório intercaladas entre amostras em cada lote de análise foi ≤ 0,1 ‰. Os principais sinais de massa de N e C foram usados para calcular as abundâncias totais de N e C, usando OAS (Microanálise Elementar, Devon, Reino Unido), com 1,47% N e 39,53% C como materiais de referência de composição elementar. Os resultados de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ e C/N foram analisados usando ANOVA para avaliar o efeito das interacções (regime de fogo, tipo de solo e espécies de plantas).

2.3. Resultados

2.3.1. Análise Metagenómica

2.3.1.1. Resultados da sequenciação

A sequenciação por Ilumina MiSeq gerou 96 144 192 pares de bases totais e 211 854 *reads* com uma razão média G/C de 57.32% (Apêndice 1). Destes, 97,46 % passaram o filtro de Q20 e 90,80 % passaram o filtro de Q30, após remoção das sequências de baixa qualidade e quimeras (Apêndice 1).

No total foram contabilizados 24 747 OTUs (*Operational Taxonomic Units)*. Na rizosfera de *Brachystegia spiciformis* foram identificados 1 143 e 1 083 OTUs em amostras de solos argilosos provenientes de áreas com alta e baixa frequencia de fogo (FF), respectivamente. No caso de *B. boehmii* foram identificados 1 076 e 1 086 no mesmo tipo de solos e em áreas com alta e baixa FF, respectivamente. Em solos arenosos foram identificados 895 (alta FF) e 1 072 (baixa FF) na rizosfera de *B. spiciformis*. Em *B. boehmii* foram identificados 1 083 (alta FF) e 855 (baixa FF). (Tabela 2.2).

2.3.1.2. Distribuição de OTUs

As leituras do sequenciamento identificaram 21 filos, 51 classes, 98 ordens, 193 famílias, 520 géneros e 1001 espécies. Entre os mais abundantes filos destacam-se *Actinobacteria* (35%), *Acidobacteria* (19%), *Proteobacteria* (20%), *Firmicutes* (10%) e *Verrucomicrobia* (6%) (Fig. 2.2). As classes mais abundantes foram *Actinobacteria* (29%), *Bacilli* (19%), *Alphaproteobacteria* (19%) e *Rubrobacteria* (8,5%). As ordens mais abundantes foram *Rhizobiales* (14%), *Streptomycetales* (12%), *Gaiellales* (11%) e *Blastocatellales* (7%). As famílias mais abundantes foram *Streptomycetaceae* (7%), *Gaiellaceae* (7%), *Chthoniobacteraceae* (6%) e *Pyrinomonadaceae* (6%). Os géneros mais abundantes foram *Streptomyces* (11%), *Gaiella* (11%), *Chthoniobacter* (10%) e *Bacillus* (6%). As espécies mais abundantes foram *Gaiella oculta* (7%), *Chthoniobacter flavus* (6%), *Streptomyces cinnabarigriseus* (5%) e *Rhodoplanes tepidicaeni* (5%).

2.3.1.3. Distribuição das espécies de bactérias mais comuns

No total foram identificadas 22 espécies bacterianas mais comuns, cuja abundância variou de acordo com a espécie de planta, o tipo de solo e o regime de fogo (Fig 2.3). Assim, na rizosfera argilosa de *B. spiciformis* a elevada FF promoveu a ocorrência de *Streptomyces megasporois* e *Aciditerrimonas ferrireducens* em detrimento de *Lactobacillus ixorae* e *Streptomyces cinnabarigriseus*, enquanto que em *B. boehmii* o fogo promoveu a ocorrência de *Actinoplanes subtropicus*, *Aciditerrimonas ferrireducens* e *Rubobacter spartanus* em detrimento de *Streptomyces cinnabarigriseus*, *Bacillus cucumis* e *Bacillus flexus*. Em ambos os casos,

observaram-se também variações percentuais relativas à abundância dos outros OTUs. Em solos arenosos, a variação na abundância de OTUs foi mais proeminente, destacando-se (i) o aparecimento das espécies *Paludibaculum fermentans* e *Solirubrobacter ginsenosidimutans* na rizosfera de *B. spiciformis* (alta FF) em detrimento da espécie mais abundante (*Lactobacillus plantarum,* 16%) em zonas de baixa FF; e (ii) aparecimento das espécies *Saccharopolyspora antimicrobica* e *Bacillus flexus* na rizosfera de *B. boehmii* (alta FF) em detrimento das duas espécies mais abundantes (*Lactobacillus rhamnous* e *Lactobacillus plantarum*) em zonas de baixa FF.

2.3.1.4. Análise funcional das comunidades bacterianas

As 1001 espécies de bactérias identificadas da rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* foram classificadas usando o MG-RAST para determinação da diversidade funcional (Fig. 2.4). Foram identificados 21 grupos funcionais, dos quais cerca de metade foram agrupados nas seguintes categorias: (i) compostos biológicos activos (18%), metabolismo de nitrogénio (10%), metabolismo de proteínas (12%), metabolismo de aminoácidos (6%), aminoácidos e derivados (6%). Dentro das categorias funcionais, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) foram divididas em cinco grupos: fixadoras de nitrogénio (15.7%), solubilização de fosfato (22.2%), sequestro de ferro (14.2%) produtoras de sideróforos (21.6%) e tolerância ao stresse ambiental (19.2%) e as fitopatogénicas representaram uma categoria menos representada (6.9%). A abundância destes dois grupos de bactérias variou de acordo com o tipo de solo, espécie de planta e regime de fogo (Fig. 2.5 e 2.6).

2.3.1.5. Distribuição de bactérias fixadoras de nitrogénio

Foram identificados 16 géneros de bactérias fixadoras de nitrogénio, cuja abundância variou de acordo com o tipo de solo, espécie de planta e regime de fogo (Fig. 2.7). Em solos argilosos, destaca-se o efeito da elevada FF no surgimento de *Burkholderia* e *Pseudomonas* (em detrimento de *Rhizomicrobium*) na rizosfera de *B. spiciformis* e de *Burkholderia* em *B. boehmii*.

2.3.1.6. Diversidade de comunidades e curva de rarefacção

Para estudar a diversidade bacteriana em cada área, foi calculado o índice de Shannon (H'), índice de Simpson (D) para cada nível taxonómico com 97% de similaridade. Considerando a rizosfera de *B. boehmii,* a diversidade da comunidade bacteriana expressa pelo índice de Shannon foi maior no solo argiloso do que no solo arenoso quer em regime de fogo alto (7,86 vs. 7,44) ou de fogo baixo (7,53 vs. 6,28; Fig. 8; Apêndice 2). O mesmo se verificou para a rizosfera de *B. spiciformis* dado que a diversidade também foi maior em solo argiloso do que arenoso, quer em regime de fogo alto (7,88 vs. 7,71) ou de fogo baixo (7,62 vs. 6,09; Fig. 8; Apêndice 2). No entanto, convém salientar os valores inferiores indicados para as amostras SBBP011 (5,03) e SBSP013 (4,26) como possíveis *outliers*, distorcendo os valores obtidos para a diversidade em solos arenosos de fogo baixo. As curvas de rarefacção mostraram boa saturação de sequências nas amostras recolhidas (Fig. 2.9), sugerindo que grande parte da diversidade de microrganismos presentes nas amostras foi caracterizada.

2.3.1.7. Análise de coordenadas principais (PCoA)

A análise de PCoA não mostrou tendências de agrupamentos entre as amostras relativamente ao regime de fogo (Fig. 2.10A), tipo de solo (Fig. 2.10B) ou mesmo entre as duas espécies (Fig. 2.10C). As duas coordenadas mais informativas relativamente ao tipo de fogo foram a PC1 e a PC3 que explicaram 47,07% e 12,39% e respectivamente (Fig. 2.10A). As duas coordenadas mais informativas relativamente ao tipo de solo foram a PC2 e a PC3 que explicaram 14,31 e 12,39% da variação, respectivamente (Fig. 2.10B). As duas coordenadas mais informativas para as duas espécies foram a PC1 e a PC2 que explicaram 47,07 e 12,37% da variação, respectivamente (Fig. 2.10C).

2.3.2. Ecologia de isótopos

2.3.2.1. Tendência geral das razões isotópicas do nitrogénio e carbono e dos conteúdos em C e N

No total as composições isotópicas de carbono ($\delta^{13}C$), nitrogénio ($\delta^{15}N$) e a percentagem de C/N foram determinadas em 38 amostras correspondentes a *B. spiciformis* (19) e *B. boehmii* (19; Apêndice 3) As folhas de *B. spiciformis* de solos argilosos foram enriquecidas em $\delta\ ^{15}N$ em relação às de *B. boehmii* no mesmo solo (Tabela 2.2).

2.3.2.2. Variação da razão isotópica (δ15N δ13C) e de C/N

Os valores de $\delta^{15}N$ das folhas de *B. spiciformis* e *B. boehmii* que cresceram no solo argiloso em zonas de alta FF variaram de 1,4 ‰ a 2,6 ‰ e em zonas de baixa FF de 0,2 ‰ a 2,9 ‰, valores próximos aos da fixação biológica de nitrogénio. Em plantas de solos arenosos em zonas de alta FF, estes valores variaram de 1,3 ‰ a 2,6‰ (Fig 2.11). Para $\delta^{13}C$, os valores obtidos variaram de -29,2 ‰ a -25,8 ‰ em plantas sujeitas a alta FF e de -28,6 ‰ a -26,6 ‰ em condições de baixa FF (Fig 2.12). A permilagem de C/N das folhas de *B. spiciformis* que cresceram no solo argiloso sob alta FF variou de 28,2 ‰ a 24,6‰. No solo arenoso em zonas de alta FF os valores variaram de 29,2‰ a 27,7‰. No caso de *B. boehmii* os valores variaram de 38,3‰ a 29,8 3‰ em plantas que cresceram em solos argiloso e alta FF, e de 38,6 ‰ a 25,87 ‰ a baixa FF (Fig. 2.13).

Os valores médios de $\delta^{15}N$ das folhas de *B. boehmii* foram significativos no solo argiloso ($P < 0.05$, Tabela 2.3). Comparando as duas espécies em função das interacções (Solo x Fogo x Espécie), verificou-se uma diferença significativa para $\delta^{15}N$ ($P < 0.05$, Apêndice 4).

2.3.2.3. Análise de componentes principais dos isótopos

O agrupamento das variáveis ($\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$ e C/N) em torno das espécies mostrou tendências de formação de dois clusters diferenciados englobando *B. spiciformis* e *B. boehmii* (Fig. 2.14). As duas coordenadas mais informativas explicaram 58,37% de variabilidade total (40,14% e 18.23% para PC1 e PC2, respectivamente).

2.4. Discussão

2.4.1. Sequenciamento, Análise de OTUs e Diversidade Funcional

De acordo com os resultados obtidos, o sequenciamento do gene 16S rDNA mostrou ser uma ferramenta molecular robusta para caracterização da rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii*, com índices de qualidade de 97,5 % (Q20) e 90,9% (Q30) (Apêndice 1). Estes índices são de extrema relevância para estudos com espécies desconhecidas, porque dão uma previsão da probabilidade de erro e precisão das sequências analisadas (Ewing et al. 2015; Zhou et al. 2019). Em conformidade, a sequenciação do gene 16S rDNA resultou num número elevado de sequências (cerca de 1000 OTUs por condição experimental; Tabela 2.2) que foram utilizadas para identificar a diversidade bacteriana existente na rizosfera das espécies em estudo. O gene 16S rDNA tem sido bastante usado em estudos de diversidade microbiana pela sua precisão na discriminação de espécies procariotas (Castañeda et al. 2015). Em termos taxonómicos, observou-se uma semelhança ao nível do filo em todas as amostras analisadas, embora com abundâncias relativamente diferentes em função do tipo de solo, regime de fogo e espécie de planta.

De acordo com a análise taxonómica, foi identificado um total de 21 filos, congregando uma grande diversidade de classes, ordens, famílias, géneros e espécies com vasta multiplicidade de funções. De uma forma geral, independentemente do tipo de solo, espécie de planta ou regime de fogo, os filos mais abundantes foram *Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Firmicutes* e *Verrucomicrobia*, representando cerca de 90 % dos filos (Fig 2.2). Bactérias pertencentes a estes filos participam nos ciclos do carbono, nitrogénio e enxofre e são responsáveis pela produção de metabolitos secundários associados à resistência das plantas a patógenos (Uroz et al. 2013; Castro 2015; Castañeda & Barbosa 2017). Além do mais, estão adaptadas a solos pobres e condições extremas, como a aridez ou elevadas temperaturas (Araujo et al. 2012; Neilson et al. 2012; Rughöft et al. 2016; Meneghine et al. 2017) e contêm bactérias simbióticas importantes para a nutrição e saúde vegetal (Ganz et al. 2012; Jung et al. 2016; Lan et al. 2017; Dube et al. 2019).

O efeito do fogo no microbioma depende de vários factores, tais como ambientais e biogeoquímicos (Mataix-Solera et al. 2009; Rodríguez et al. 2013). O calor libertado pode resultar na mortalidade de diferentes grupos microbianos, como por exemplo de algumas bactérias fixadoras de N do género *Nitrobacter*, enquanto outras heterotróficas são mais resistentes a altas temperaturas (Kim et al. 2003). No entanto, os efeitos do fogo podem variar de um ecossistema para outro. Por exemplo, em uma floresta temperada de pinheiros na Turquia e em uma densa vegetação mediterrânea dominada por *Rosmarinus officinalis*, o fogo teve um efeito positivo na abundância de bactérias do solo, que aumentou após três meses da passagem de fogo (Goberna et al. 2012). Ao contrário, nas florestas das montanhas do Colorado (EUA), o fogo não teve efeito positivo na diversidade e abundância dos principais grupos bacterianos em solos rochosos (Jiménez Esquilín et al. 2007). Por outro lado, Tobin & Janzen (2008) não encontraram mudanças consideráveis entre comunidades bacterianas em áreas sob regime de baixa e alta frequência do fogo (FF), 12 meses após passagem do último fogo, indicando que as bactérias do solo têm a capacidade de se recuperar relativamente rápido, tal como parece ser o caso do microbioma de *B. spiciformis* e *B. boehmii*.

A elevada FF promoveu a ocorrência de bactérias tolerantes a stresses abióticos na rizosfera argilosa de *B. spiciformis* (*Streptomyces megasporois* e *Aciditerrimonas ferrireducens*) e *B. boehmii* (*Actinoplanes subtropicus*, *Aciditerrimonas ferriredecens* e *Rubobacter spartanus*), bem como na rizosfera arenosa de *B. spiciformis* (*Paludibaculum fermentans* e *Solirubrobacter ginsenosidimutans*) e de *B. boehmii* (*Saccharopolyspora antimicrobica* e *Bacillus flexus*) em substituição de outras espécies com idênticas funções no ecossistema. Esses organismos estão associados a diversas funções, directa ou indirectamente relacionadas com a promoção do crescimento vegetal, tais como a reciclagem e disponibilização de nutrientes, e a decomposição de carbono orgânico (Pereira et al. 2008; Devine et al. 2012; Fierer et al. 2012; Rilling et al. 2019). As funções relacionadas com a reciclagem e disponibilização de nutrientes, sendo essenciais para o funcionamento dos ecossistemas, poderão ser exploradas no futuro para valorização destas espécies nos sectores agrícola e ambiental, nomeadamente através da produção de biofertilizantes e sequestradores de carbono em contexto de alteração do clima. A assinalar ainda a presença de bactérias cujas aplicações industriais e ambientais merecem

atenção particular: (i) *Streptomyces* spp., cuja tolerância ao fogo varia em função da espécie e do tipo de solo, com potencial para a produção de antibióticos e afins, bem como a degradação de celulose e lignina (Landwehr et al. 2018; Rilling et al. 2019); (ii) *Lactobacillus* spp., cujos níveis reduzem drasticamente em zonas de elevada FF, com potencial na industria de fermentação (Techo et al. 2016); e (iii) *Bacillus flexus*, cuja tolerância ao fogo parece depender da estirpe, com potencial para projectos de bioremediação ambiental (Jebeli et al 2017).

Em termos globais, o estudo encontrou várias bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) como, fixadoras de nitrogénio, solubilização de fosfato, sequestro de ferro, produtoras de sideróforos, e tolerância ao stresse ambiental, cuja abundância variou de acordo com o tipo de solo, espécie de planta e regime de fogo (Fig. 2.5 e 2.6). No seu conjunto estas PGPB parecem contribuir para a redução da presença de bactérias fitopatogénicas (que representam apenas 7% do total) e melhoria do respectivo estado fitossanitário das plantas, bem como para a activação de mecanismos de defesa celular e biodisponibilidade de nutrientes (Farina et al. 2012; Numan et al. 2018).

Entre o grupo de fixadores simbióticos de nitrogénio, destaca-se o género *Bradyrhizobium*, cuja abundância tem sido reportada em diferentes tipos de solo e associada ao seu caracter cosmopolita e à nodulação de leguminosas em África (Jaiswal & Dakora 2019), nomeadamente na rizosfera de *Albizia versicolor* no PNG (Teixeira & Rodríguez-Echeverría 2016). No entanto, há ainda a salientar a grande diversidade de fixadores de azoto (16 género no total) que, embora variável em função do regime de fogo e do tipo de solo, oferece um enorme potencial para a formulação de biofertilizantes.

2.4.2. Diversidade da comunidade

Os índices de diversidade foram aplicados para analisar a diversidade de espécies e para avaliar as diferenças na complexidade das espécies entre as amostras. Tanto o índice de Shannon como o de Simpson foram mais altos em solos com alta FF do que em solos com baixa FF independentemente da espécie, sugerindo que a microflora das duas leguminosas de Miombo é tolerante ao fogo e/ou tem uma recuperação rápida mesmo em caso de regimes de fogo mais

intensos (Kara & Bolat 2009; Tobin & Janzen, 2008). De facto, embora o fogo esteja associado à perda de diversidade bacteriana, a resposta é variável consoante o tipo de bactérias e o contexto ambiental geral (Smith et al. 2008; Whitman et al. 2019), e em certos casos observa-se uma rápida de recolonização derivada da disponibilização de nutrientes nas cinzas deixadas após a passagem do fogo (Rodríguez et al. 2013; Feng et al. 2018). Por outro lado, considerando que o fogo é um dos principais factores que condicionam a dinâmica da biodiversidade das florestas de Miombo e que em toda a África o ecossistema está exposto a fogos frequentes, acredita-se que as espécies *B. spiciformis* e *B. boehmii* possam ter desenvolvidos várias estratégias de tolerância ao fogo, como a presença de cristais de oxalato de cálcio (Makhado et al. 2014). Portanto, é bem possível que as bactérias do solo também estejam adaptadas aos fogos contínuos e que as mudanças induzidas pelo fogo afectem apenas a biomassa microbiana durante um período relativamente curto (no nosso caso, 12 meses, a data dos últimos fogos em locais de alta FF).

2.4.3. Ecologia Isotópica

Testou -se a hipótese de que o fogo altera a composição isotópica de carbono $\delta^{13}C$ e nitrogénio $\delta^{15}N$ em folhas de *B. spiciformis* e *B. boehmii* que cresceram no solo arenoso e argiloso. No entanto, existe uma variação das médias entre o regime de fogo, tipo de solo e espécie de planta.

A comparação da constituição isotópica de $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ nas folhas mostra valores semelhantes para o $\delta^{13}C$. No entanto, o mesmo não se verifica na análise da distribuição isotópica de $\delta^{15}N$, que exibe uma clara diferença entre *B. spiciformis* e *B. boehmii* em ambos os regimes de fogo. Assim, *B. boehmii* apresentou valores enriquecidos de $\delta^{15}N$ no solo argiloso com alta FF e empobrecidos com baixa FF, enquanto *B. spiciformis* apresentou valores empobrecidos nos dois tipos de solo (Fig. 2.12). Isto pode estar relacionado com uma resposta ecofisiológica diferencial das duas espécies em relação à remoção de nutrientes por volatilização, penetração intensa de calor e adição de cinzas no solo (Bauhus et al. 1993).

As leguminosas desempenham um papel importante na substituição do N perdido do solo, no entanto, existem poucos estudos sobre a fixação de nitrogénio em leguminosas lenhosas em Moçambique, apenas estando publicado um trabalho de pesquisa (Teixeira & Rodríguez-Echeverría 2016). A fixação de N em diferentes espécies leguminosas varia de 0.7-2 ‰ na presença de fogo. Uma das razões que pode ajudar a explicar esse facto, é que embora o fogo seja mineralizador, provavelmente as *Brachystegia* não precisam do nitrogénio do solo pois possuem capacidade de fixar nitrogénio atmosférico através da simbiose com rizóbio (Leavitt & Long 1986; Craine et al. 2015).

Os valores de $\delta^{15}N$ encontrados nas folhas de *B. boehmii* em solos arenosos com baixa FF encontram-se nos intervalos estabelecidos para fixação de nitrogénio usando a via simbiótica. A capacidade fixadora de nitrogénio de *B. boehmii* parece ser determinante para o seu estabelecimento no Miombo. As análises destas relações têm um interesse acrescido, visto que, contribuem para um planeamento adequado ao nível da gestão de habitats e do reaproveitamento dos recursos. De um modo geral, as leguminosas que habitam solos oligotróficos, arenosos apresentam valores de ^{15}N muito empobrecidos, podendo neste caso particular ser mais precisa a sua utilização como traçador da fonte de nitrogénio (Marques 2010; Rascher et al. 2011,2012; Hellman et al. 2015). Assim sendo, valores de $\delta^{15}N$ próximos de 0 – valor semelhante ao encontrado na atmosfera – costumam estar associados a plantas leguminosas fixadoras de nitrogénio (Marques 2010; Alves et al. 2006). Os nossos dados relataram que o $\delta^{15}N$ variou de 0.2‰ a 2.9 ‰ e por isso uma possível fixação simbiótica de N. Por outro lado, há evidências que a abundância natural de $\delta^{15}N$ é maior em sistemas com pouca disponibilidade de nutrientes, como é o caso do Miombo. Porém, o acesso das plantas ao N é bastante difícil e as plantas necessitam de um mecanismo para a sua disponibilização, como por exemplo o fogo, a precipitação ou a altitude.

Não existe uma clara diferença entre os valores $\delta^{13}C$ verificada entre *B. spiciformis* e *B. boehmii*. Acredita-se que o fraccionamento isotópico pós-fotossintético entre *B. spiciformis* e *B. boehmii* pode estar relacionado com um enriquecimento em ^{13}C aquando da formação do material lenhoso (Cernusak et al. 2009). Para além disso, as diferenças de $\delta^{13}C$ entre *B. spiciformis* e *B.*

boehmii realçam um fraccionamento isotópico não só entre as espécies como ao longo do percurso da distribuição de carbono na planta. A *B. boehmii* teve valores de $\delta^{13}C$ mais negativos do que os *B. spiciformis*. Essa diferença pode ser atribuída a variações genéticas dentro das espécies, além de factores abióticos como stresse hídrico, que pode ter ocorrido no local de amostragem, resultando em menor discriminação $\delta^{13}C$. Os valores mais baixos de $\delta^{13}C$ são conhecidos por ser indicativo de uma redução da condutância estomática em resposta ao stresse abiótico. No entanto, se as plantas não estão sob stresse ambiental, os estomas permanecem abertos e a discriminação é alta (Kurdali & Al-shamma 2015).

Consistente com a hipótese de que o fogo altera as propriedades químicas e físicas do solo, o $\delta^{13}C$ foliar aumentou com a intensidade do fogo, e significativamente em *B. boehmii* em relação a *B. spiciformis*. O $\delta^{13}C$ tem sido utilizado para inferir o estado fisiológico das plantas porque reflete a razão entre a concentração intracelular de CO_2 e a do ambiente (Farquhar et al. 1989; Brugnoli 2000). Os aumentos que observamos em $\delta^{13}C$ são provavelmente devido ao aumento da limitação de nutrientes, melhorando a resistência interna aumentada da difusão de CO_2. As plantas frequentemente têm $\delta^{13}C$ alto (valores empobrecidos em ^{13}C) quando a disponibilidade da água é baixa porque o stresse hídrico causa fechamento estomático, o que leva a um menor fraccionamento durante a fotossíntese (Farquhar et al. 1989; Brugnoli 2000). Os nossos resultados estão de acordo com esta observação, já que algumas parcelas se encontravam longe de pequenos cursos de água.

Os valores de $\delta^{13}C$ podem sofrer alterações devido a presença ou ausência de fogo. Em locais mais secos existe uma maior entrada de matéria orgânica do solo na estação seca. No cerrado encontraram valores de $\delta^{13}C$ foliar que variavam de -33,6 a -24,4 ‰, em leguminosas arbóreas em solos argilosos e latossolos sujeitos a fogos frequentes em que a precipitação média é de 840 mm (Coletta et al. 2009).Estas observações verificaram-se no nosso estudo, onde a precipitação varia entre 600 a 875 mm e onde observámos resultados semelhantes (Fig. 2.13;Tabela 2.3).

A razão entre o carbono e nitrogénio é importante para determinar a quantidade de carbono fixado em relação ao nitrogénio. A *B. boehmii* apresentou resultados elevados do C/N em

relação a *B. spiciformis*. Isso significa que a *B. boehmii* tem pouco nitrogénio fixado em relação ao carbono, sendo que o nitrogénio pode ser imobilizado pelos microrganismos.

As folhas com maior relação entre C/N (> 30) provavelmente decompõem lentamente com a imobilização líquida de N, enquanto as de menor proporção decompõem rapidamente (Kurdali & Al-shamma 2015). As espécies de leguminosas apresentam baixa relação C/N em suas folhas quando amostradas no final da época seca antes da senescência (Martinelli et al. 1999; Ometto et al. 2006; Nowak & Koegler 2018). O que não foi verificado no nosso resultado apesar de se ter amostrado no final da época seca. De uma maneira geral demonstrou-se que o C/N foi influenciado significativamente pelo regime de fogo, tipo de solo e a espécie. Uma melhor compreensão do padrão C/N observado exigiria dados adicionais da variação do carbono e nitrogénio no solo.

Em geral as assinaturas de $\delta^{15}N$, $\delta^{13}C$ e a razão entre o carbono e nitrogénio (C/N) das plantas aumentaram com o aumento do fogo (Fig. 2.14), no solo argiloso houve menor enriquecimento de $\delta^{15}N$ 1.6 ± 0.2 ‰ e maior enriquecimento de $\delta^{13}C$ em torno de-28 ± 0.3 ‰. Igualmente no solo argiloso para $\delta^{15}N$ houve uma diferença em alta e baixa FF, onde a alta FF apresentou 3.2 ± 0.3 ‰ e a baixa FF apresentou 2.6 ± 0.2 ‰. A presença de fogo pode ser um factor chave na mineralização dos nutrientes, por seu lado a intensidade do fogo pode ter factores preponderante na fixação de nitrogénio (Ball et al. 2010).

A análise isotópica foi consistente com dados da metagenómica, confirmando que a espécie de *B. boehmii* no solo argiloso com baixa FF apresentou maior abundância de *Bradyrhizobium* que sugere que essa espécie possui uma simbiose activa com bactérias fixadoras de N. Sendo suportado pela análise isotópica na qual apresentou valores $\delta^{15}N$ muito próximo de zero (0.75‰). Essa constatação pode predizer que a *B. boehmii* apresenta maior performance nesse habitat, aliado ao facto de ser uma das espécies conhecidas como tolerantes ao fogo (Maquia et al. 2013).

O solo foi determinante na performance das plantas para a aquisição de C e tomada de nitrogénio, bem como na flora microbiana. O solo argiloso apresentou alta abundância de

bactérias e valores empobrecidos de $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$. Esse facto deve-se a presença de micropartículas no solo que ajudam na retenção de água e nutrientes, aliado ao facto de ter pouca acidez (Telles et al. 2003) e ser resistente a erosão. Por outro lado, o solo argiloso promove estabilização química e protecção física devido aos elevados teores de argila.

A Análise de PCA mostrou formação de dois grupos distintos entre $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ (Fig. 2.15), para *B. spiciformis* e *B. boehmii*, isto quer dizer que as duas espécies apresentam diferentes mecanismos de adaptação face ao tipo de solo e regime de fogo. Supõe-se que uma ampla gama de possíveis mecanismos tais como fogo, disponibilidade de água e matéria orgânica podem afectar o $\delta^{15}N$ na vegetação da África Austral, porem estudos realizados por Robinson et al. (2000); Gonzalez-Perez et al. (2004); Craine et al. (2015). Encontraram valores semelhantes aos do presente trabalho, mas sem ter em conta a presença do fogo que pode desempenhar um papel importante na absorção de nitrogénio pelas plantas

Os dados da metagenómica foram consistentes com a análise isotópica. Confirmando que a espécie de *B. boehmii* no solo argiloso com baixa FF apresentou alta abundância de *Bradyrhizobium* que sugere que essa espécie possui simbiose com bactérias fixadoras de N. confirmando se pela análise isotópica na qual essa espécie apresentou valor de $\delta^{15}N$ próximo de zero (0.75‰). Essa constatação prediz que a *B. boehmii* apresenta maior performance nesse habitat, aliado ao facto de ser uma das espécies conhecidas como tolerantes ao fogo. A flora microbiana foi negativamente afectada pela presença de alta FF, apesar de alguns estudos (Chidumayo 1987; Ribeiro et al. 2008b) relatarem que o fogo é importante para manter a integridade e estrutura do Miombo. Esse facto pode estar aliado ao facto de que a intensidade pelo que o fogo passa elimina a flora residente na rizosfera, sendo que estudos relatam que a flora microbiana precisa de 12-14 meses para a recuperação após passagem de fogo (Tobin & Janzen 2008).

3. Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalhou efectuou-se um estudo comparativo entre duas espécies típicas de Miombo do PNG, *Brachystegia spiciformis* e *Brachystegia boehmii,* em dois tipos de solo (arenosos e argilosos) e em áreas sujeitas a diferentes frequências de fogo. Para tal, utilizaram-se tecnologias de nova geração para caracterizar a diversidade bacteriana nas respectivas rizosferas, bem como isótopos estáveis ($\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$) para analisar a performance ecofisiológica das duas leguminosas arbóreas. O presente estudo constitui um trabalho pioneiro no ecossistema de Miombo, disponibilizando abordagens modernas complementares aos estudos de ecologia e de conservação que têm vindo a ser desenvolvidos nesta importante ecorregião.

Em primeiro lugar, destaca-se a contribuição para os estudos de ecologia microbiana e prospecção biotecnológica. Assim, independentemente do tipo de solo e do regime de fogo, a dinâmica da diversidade bacteriana na rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* é muito elevada e multifuncional. No conjunto foram identificadas 21 funções biológicas predominantes, salientado-se a produção de compostos bioactivos e os processos relacionados com a aquisição e metabolismo de nitrogénio, ferro e fósforo. Tendo em conta que o maneio de fogo é importante para a conservação do ecossistema de Miombo, será importante efectuar uma monitoria a longo prazo para verificar a dinâmica da diversidade bacteriana na rizosfera de espécies prioritárias. Numa perspectiva bioeconómica, será ainda relevante explorar as funcionalidades dos microrganismos identificados para fins de produção de biofertilizantes, bioremediadores, agentes antimicrobianos, entre outros.

Em segundo lugar, a análise isotópica de $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ provou ser uma ferramenta de rastreio e bio-monitoramento dos efeitos do fogo e tipo de solo na ecofisiologia das espécies em estudo. No entanto, é importante salientar que somente essa informação não é suficiente para inferir sobre as variações dos fluxos de C e N no ecossistema, necessitando-se de mais amostras para se obter uma conclusão sólida. Em todo o caso, *B. boehmii* apresentou valores empobrecidos de $\delta^{15}N$ e $\delta^{13}C$ em solos argilosos com baixa FF, possivelmente derivados da capacidade de

fixação simbiótica de nitrogénio por bactérias do género *Bradyrhizobium*, o maior grupo taxonómico identificado na rizosfera das duas leguminosas analisadas.

Finalmente, esta abordagem multidisciplinar permite reforçar a transversalidade da problemática estudada e enfatizar a sua relevância, em diferentes campos como a gestão de habitats e a biologia da conservação. Esta abordagem na resposta à problemática associada aos fogos pode contribuir para o desenvolvimento de uma solução para este grave problema, através da disponibilização de uma solução mais abrangente, integrando vários sectores da sociedade, como universidades, agências de conservação, gestores agrícolas e florestais e associações de produtores.

Para melhor compreender a dinâmica do ecossistema de Miombo e o seu estado de conservação, no futuro recomenda-se:

- Estender os estudos a outras regiões geográficas ao nível do PNG, do país e do segmento de Miombo da África Austral, bem a outras espécies prioritárias;
- Efectuar a caracterização genética massiva das espécies de *B. spiciformis* e *B. boehmii*, bem como de outras espécies dominantes e sub-dominantes no PNG, de modo a obter uma compreensão mais sólida da resposta genética ao fogo, obedecendo a um critério de interdisciplinaridade;
- Aprofundar o estudo do potencial de fixação simbiótica de azoto, através da pesquisa de nódulos radiculares e determinação dos teores de azoto no solo;
- Caracterização de isótopos no solo de modo a ter um entendimento mais profundo da resposta fisiológica aos fenómenos antropogénicos.

Dada a importância da informação referida no trabalho, é importante que se aumente o número da amostragem para garantir a sua representatividade.

Tabela 2.1: Lista dos tipos de solo, frequência de fogo, código de amostras e coordenadas geográficas; SBSP (amostra de solo de *B. spiciformis*), SBBP (amostras de solo de *B. boehmii*).

Tipo de Solo	Frequência de Fogo	Últimos Fogos	Código das Amostras	Latitude	Longitude
Solo argiloso	Alta	1 ano	SBSP001-003	-19.00125	34.20163
	Alta	1 ano	SBBP001-003	-19.00135	34.20174
	Baixo	7 anos	SBSP006-008	-19.000094	34.20236
	Baixo	7 anos	SBBP006-008	-18.999989	34.20720
Solo arenoso	Alta	1.2 anos	SBSP016-018	-18.95165	34.17806
	Alta	1.2 anos	SBBP016-018	-18.95198	34.17942
	Baixo	8 anos	SBSP011-013	-18.96186	34.16772
	Baixo	8 anos	SBBP011-013	-18.96351	34.16873

Tabela 2.2: Distribuição de OTUs nos dois regimes de fogo (alta e baixa frequência) em solos argilosos e arenosos para as espécies em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii.*

Solo	**Espécie**	**Fogo**	**OTUs**
Argiloso	*B. spiciformis*	Alto	1143
		Baixo	1083
	B. boehmii	Alto	1076
		Baixo	1086
Arenoso	*B. spiciformis*	Alto	895
		Baixo	1072
	B. boehmii	Alto	1083
		Baixo	855

Tabela 2.3: Média e desvios padrão das razões de isótopos de nitrogénio ($\delta^{15}N$), carbono ($\delta^{13}C$), % de nitrogénio tecidual, % de carbono tecidual e rácio de C/N de *B. spiciformis* e *B. boehmii*, em solos argilosos e arenoso e em regime de alta e baixa FF.

Solo	Espécie	Fogo	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$	%N	%C	C/N
Argiloso	*B. spiciformis*	Alto	1.8± 0.2	-28.2± 0.2	1.6± 0.2	43.9± 0.9	27.9± 2.3
		Baixo	1.9± 0.2	-27.4± 0.3	1.8± 0.1	45.7± 0.8	26.1± 2.5
	B. boehmii	Alto	2.1± 0.1	-27± 0.3	1.5± 0.2	47.1± 1.1	31.1± 2.9
		Baixo	0.7± 0.2	-28.2± 0.4	1.5± 0.2	47.5± 1.2	31.6± 3
Arenoso	*B. spiciformis*	Alto	2.2± 0.2	-27.2± 0.2	1.7± 0.1	44.2± 1.4	26.9± 2.3
		Baixo	2.0± 0.2	-27.8± 0.3	1.6± 0.1	44.8± 1.1	27.7± 2.5
	B. boehmii	Alto	1.6± 0.1	-27.6± 0.3	1.5± 0.2	48± 1.1	31.8± 2.9
		Baixo	1.7± 0.2	-27.8± 0.4	1.3± 0.1	48.2± 0.2	36.7± 3

Tabela 2.4: Análise de $\delta^{15}N$ nos dois regimes de fogo (alta e baixa frequência) em solos argilosos e arenosos para as espécies em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii.*

	B. spiciformis			***B. boehmii***		
	F	**df**	**P**	**F**	**df**	**P**
Intercept	54906.76	5	0	20421.5	5	0
Solo	0.95	5	0.4	0.9	5	0.5
Fogo	0.71	5	0.6	4.9	5	0.01
Solo vs Fogo	1.32	5	0.3	2.2	5	0.12

Tabela 2.5: Análise de homogeneidades das médias nas variáveis significativas $^{\delta 15}$N *B. boehmii* (MS = 15.62, df = 14).

	Tratamento (solo vs fogo)		**Media δ ^{15}N**	**1**	**2**
2	Argiloso	Baixo	0.7		****
4	Arenoso	Baixo	1.4	****	****
3	Arenoso	Alto	1.6	****	
1	Argiloso	Alto	2.1	****	

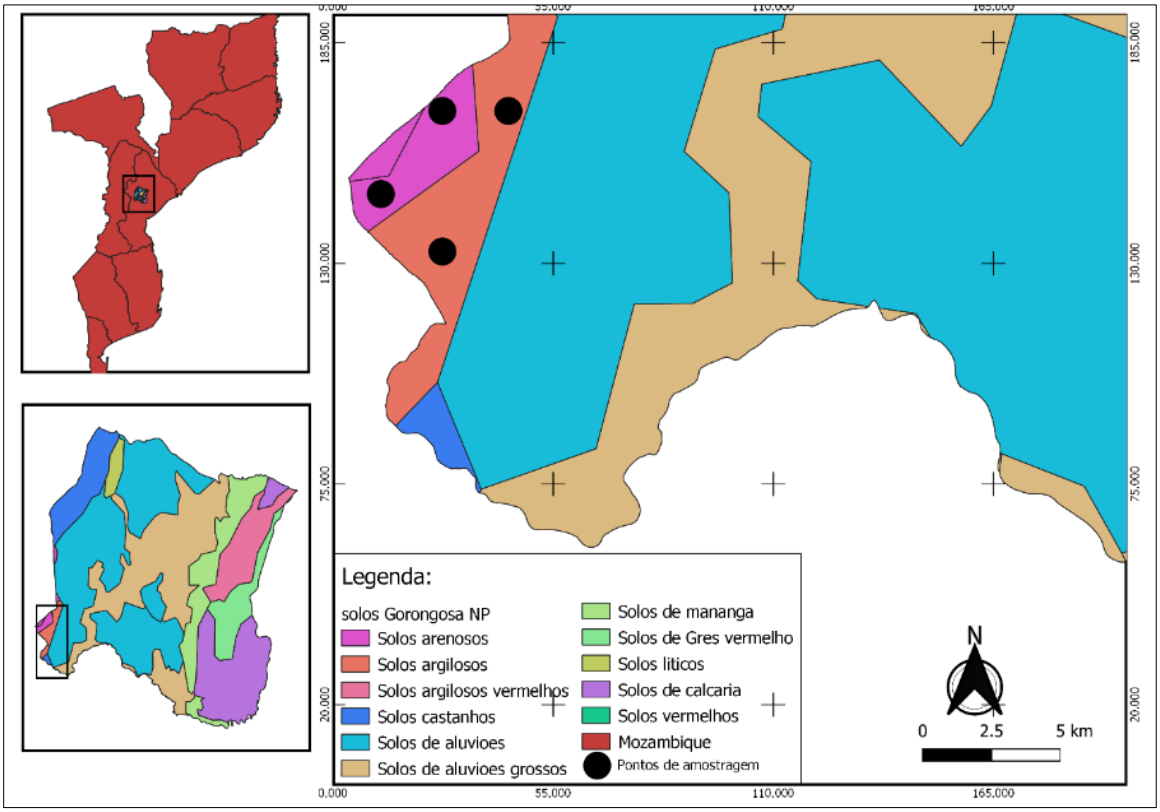

Figura 2.1: Localização geográfica da área de estudo, com os pontos de amostragem assinalados (círculos pretos). Fonte: Autor 2019.

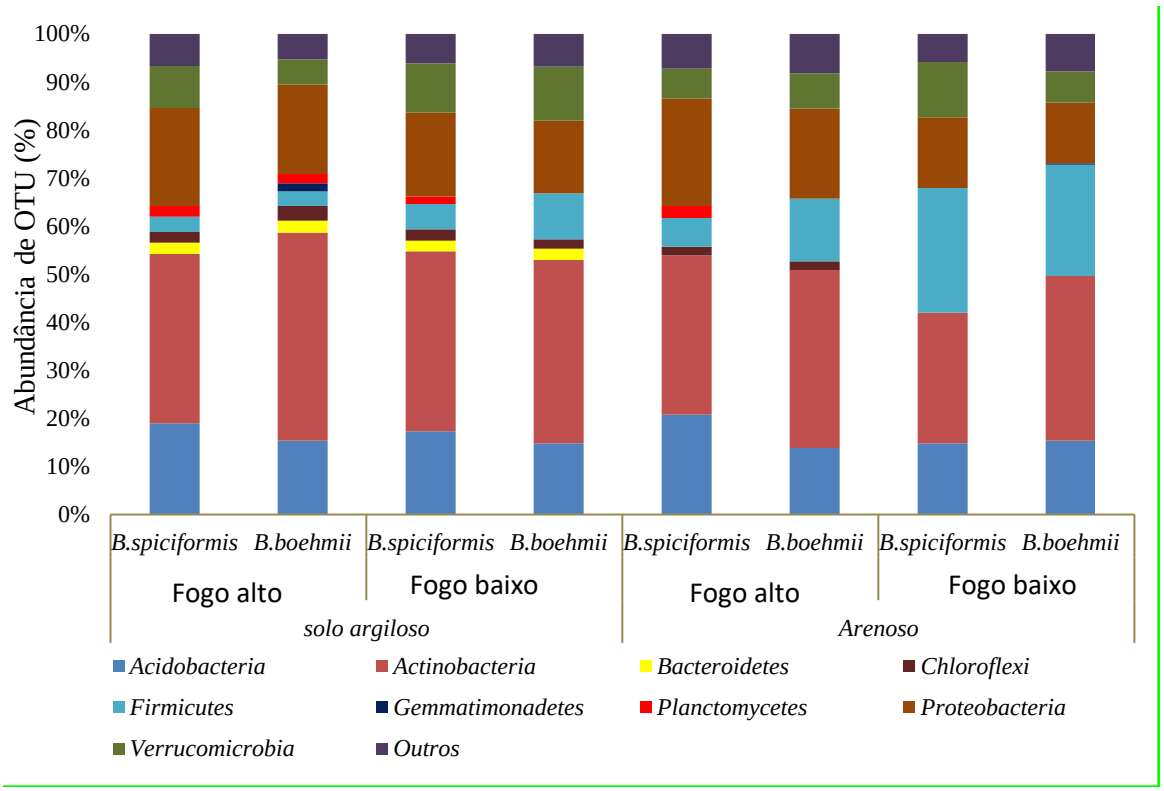

Figura 2.2: Abundância relativa dos principais grupos taxonómicos ao nível do filo na rizosfera das duas espécies em estudo, *B. spiciformis* e *B. boehmii*, em solos argiloso e arenosos em regime de alta e baixa FF. Os filos com OTUs <1% e não identificados estão agrupados como outros.

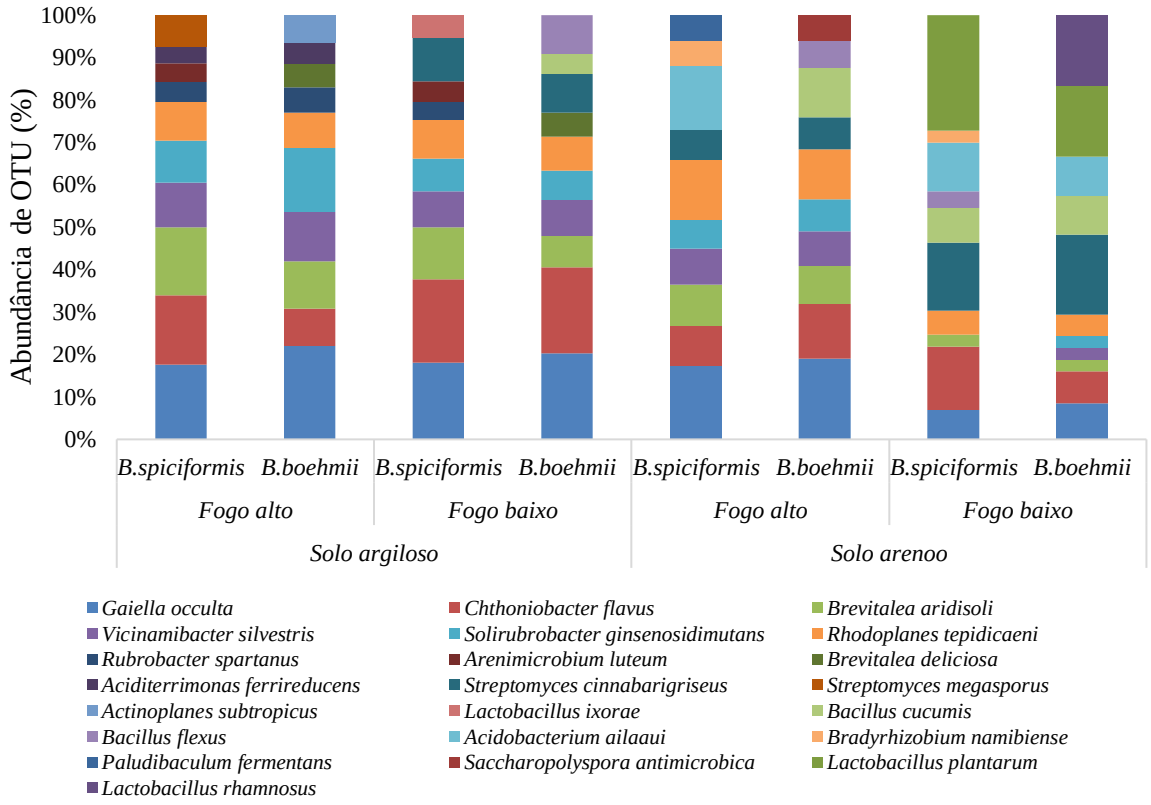

Figura 2.3: Abundância relativa das espécies mais comuns na rizosfera das duas espécies em estudo (*B. spiciformis* e *B. boehmii*) em solos argilosos e arenosos em regime de alta e baixa FF. Setas: alterações mais proeminentes na rizosfera de cada espécie e tipo de solo, em função do regime de fogo.

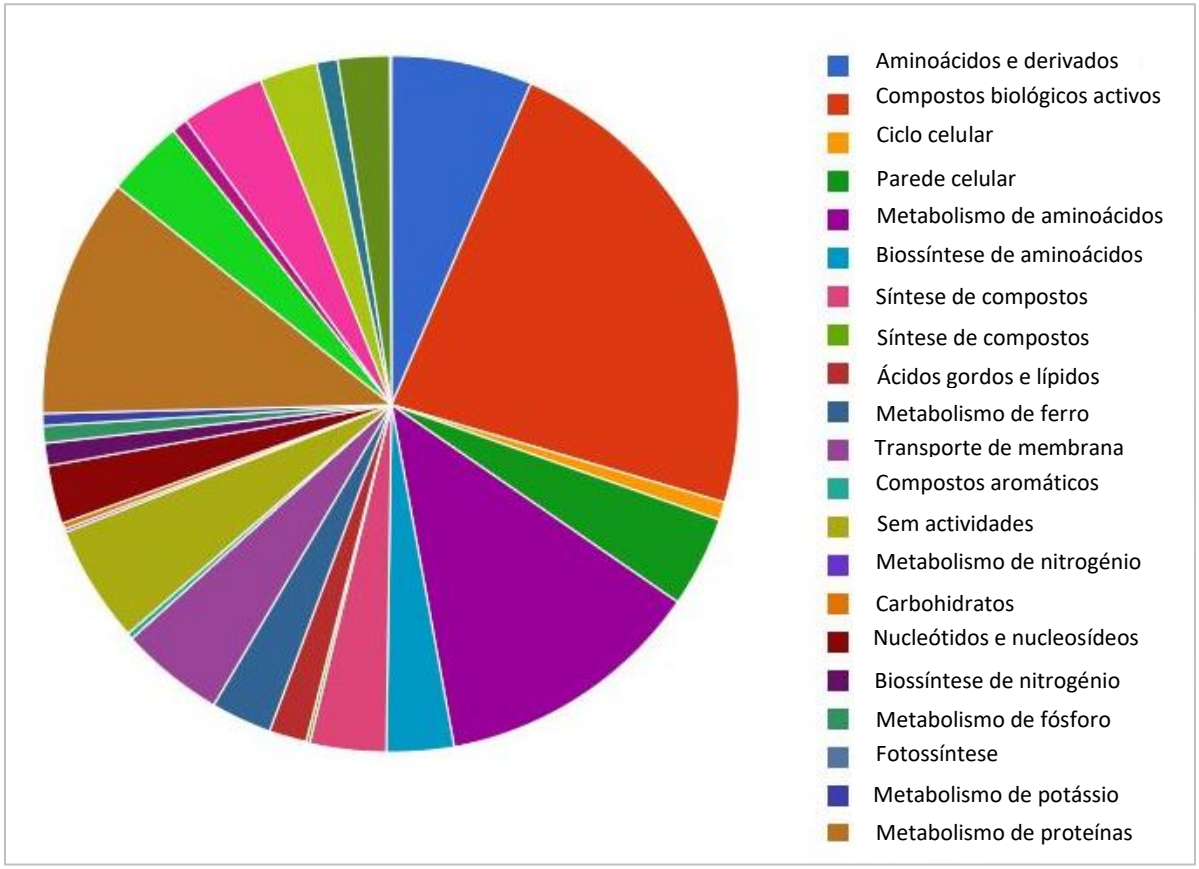

Figura 2.4: Categorias funcionais do metagenoma da rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* em alta e baixa FF produzido usando dados da ontologia dos subsistemas de nível 1.

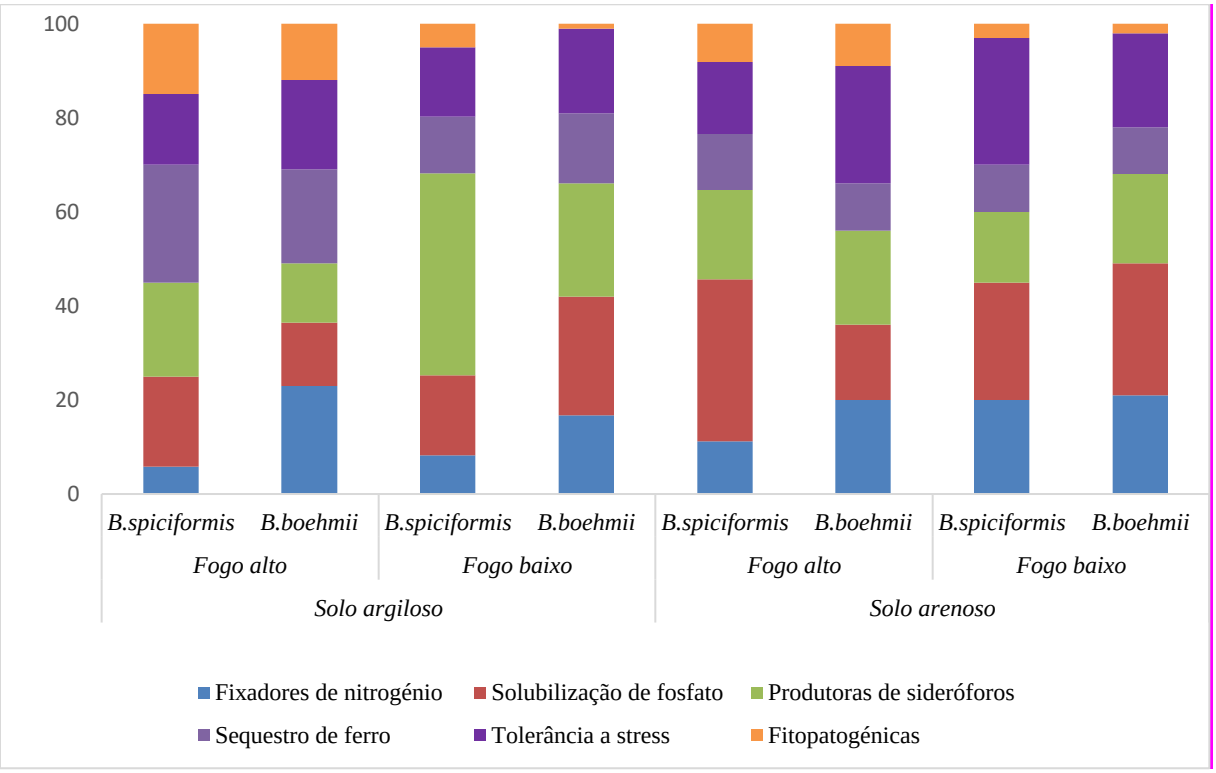

Figura 2.5: Frequência relativa (%) das actividades funcionais das bactérias promotoras de crescimento.

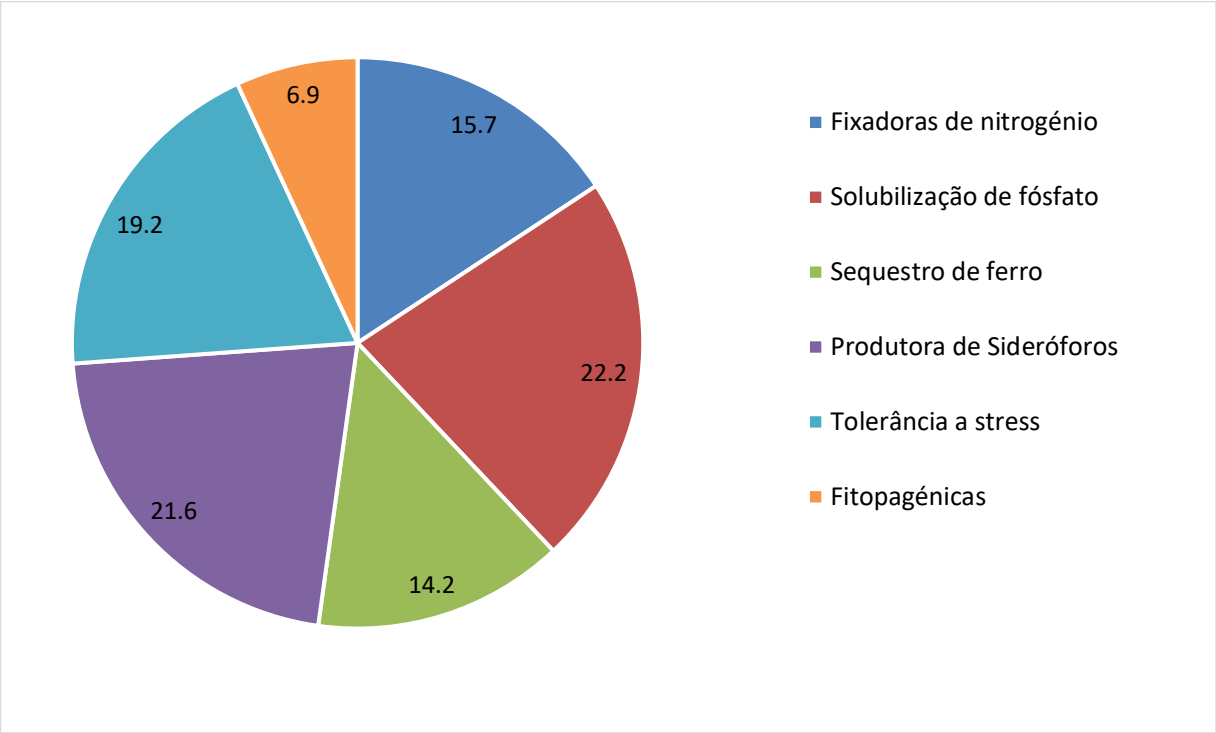

Figura 2.6: Frequência relativa (%) das actividades funcionais das bactérias promotoras de crescimento no pool geral de amostras.

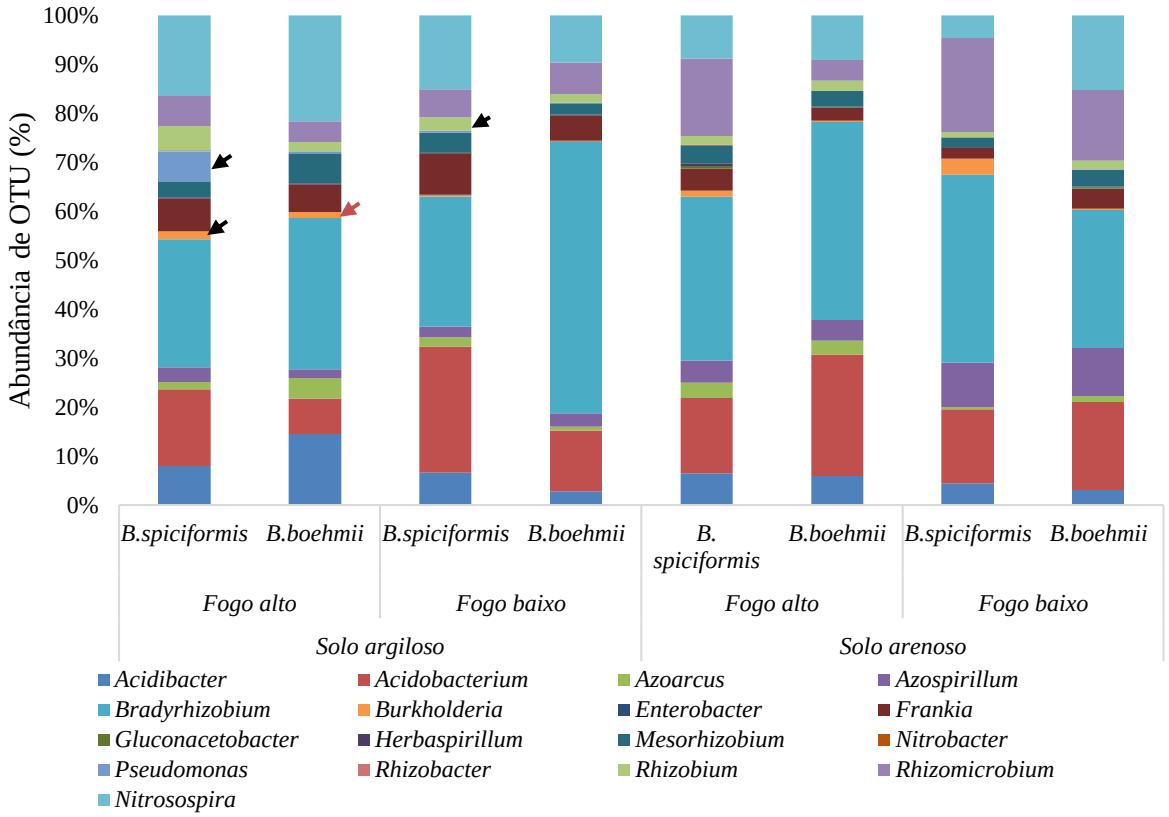

Figura 2.7: Abundância relativa de OTUs de bactérias fixadoras de nitrogénio na rizosfera das duas espécies em estudo (*B. spiciformis* e *B. boehmii*) em solos argilosos e arenosos. Setas: alterações mais proeminentes na rizosfera de cada espécie e tipo de solo, em função do regime de fogo.

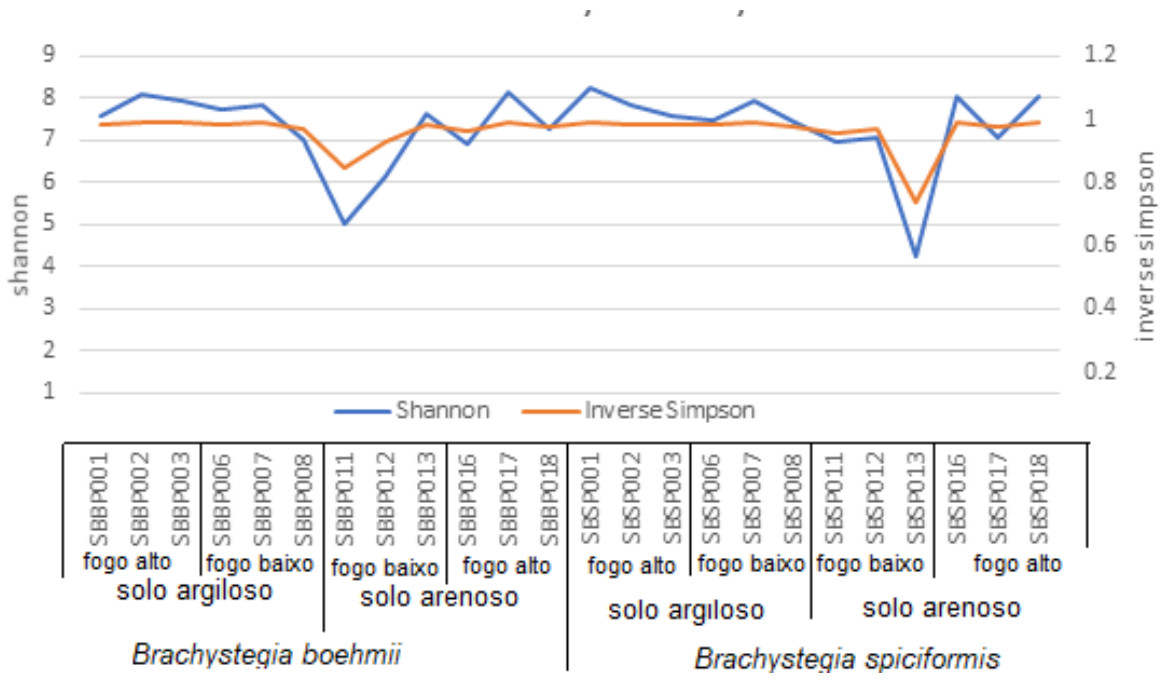

Figura 2.8: Estimativa da diversidade microbiana através do índice Shannon (azul) e diversidade inversa de Simpson (laranja) na rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* em áreas de alta e baixa frequência de fogo.

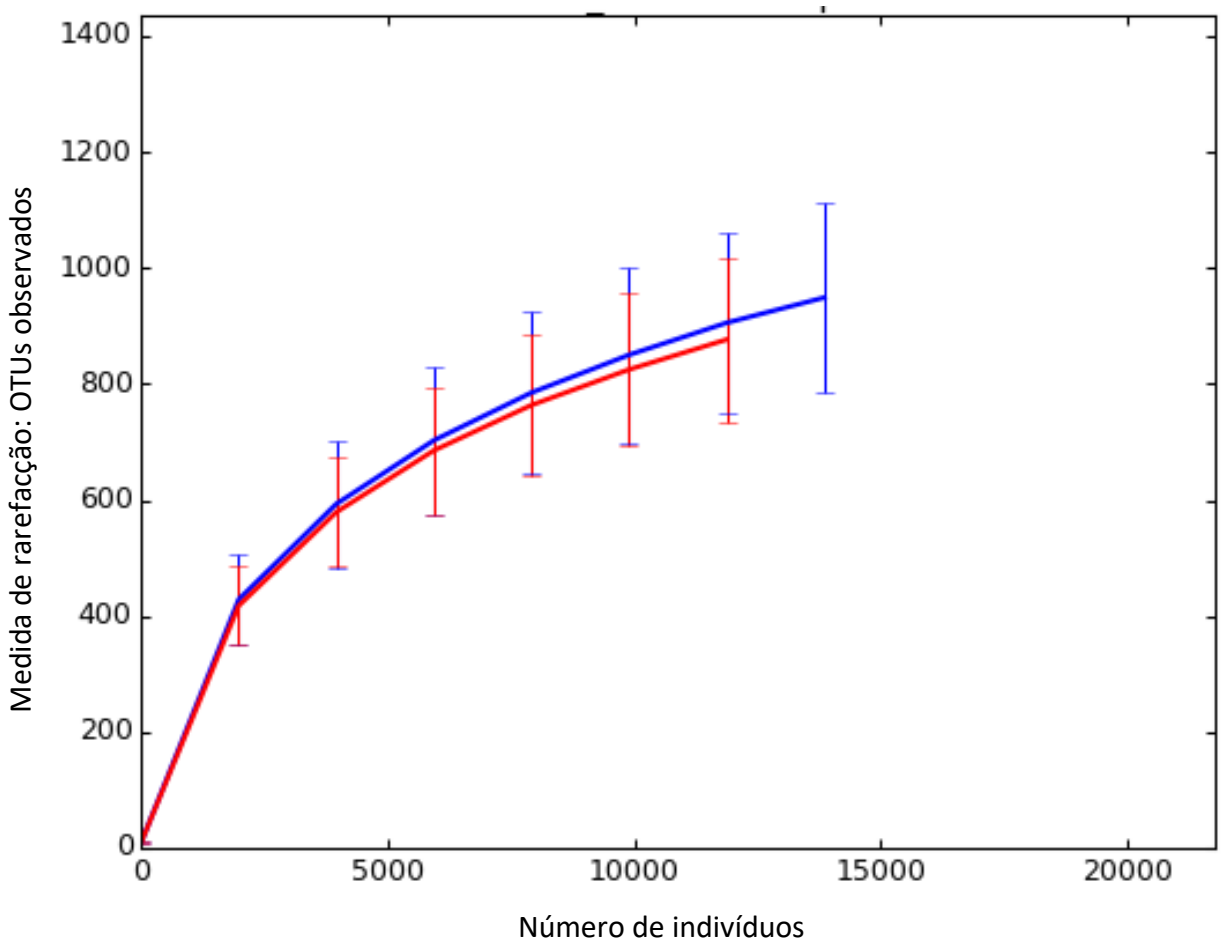

Figura 2.9: Curva de rarefacção das diferentes amostras microbianas da rizosfera de *B. boehmii* (vermelho) e de *B. spiciformis* (azul).

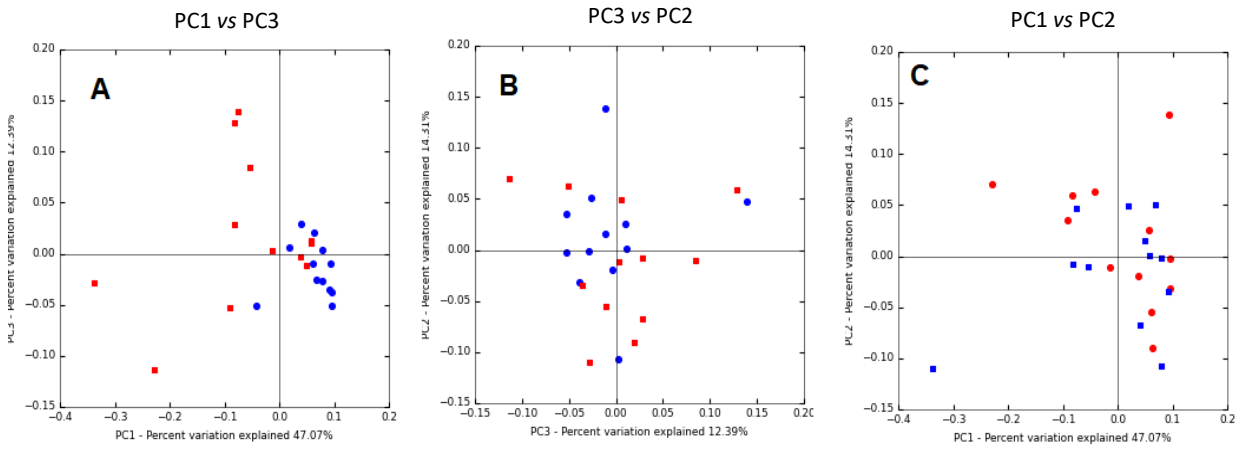

Figura 2.10: Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando as relações de similaridade entre amostras da comunidade bacteriana pertencentes à rizosfera de *B. spiciformis* e *B. boehmii* usando a métrica de distância ponderada do UniFrac: (**A**) Regime de fogo (PC1 *vs* PC3); (**B**) Tipo de solo (PC3 *vs* PC2; e (**C**) Espécie (PC1 *vs* PC2). O vermelho (quadrado) e o azul (círculo) indicam as espécies *B. spiciformis* e *B. boehmii*, respectivamente.

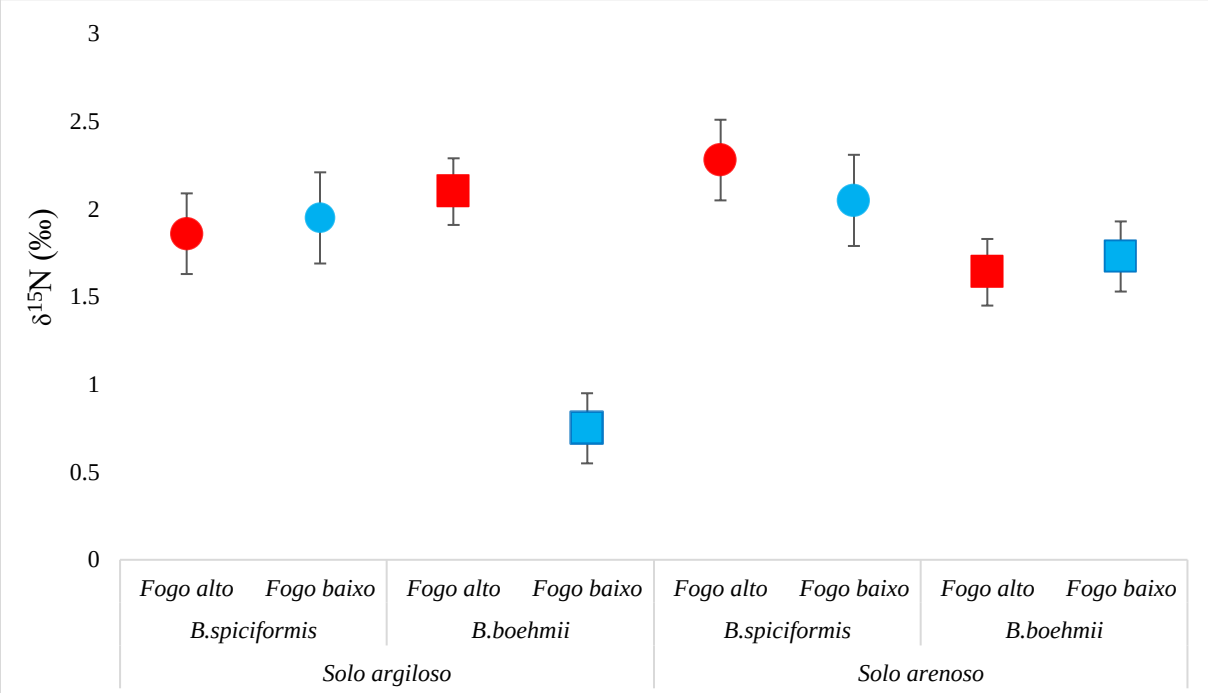

Figura 2.11: Abundância natural de $\delta^{15}N$ nos tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul baixa FF.

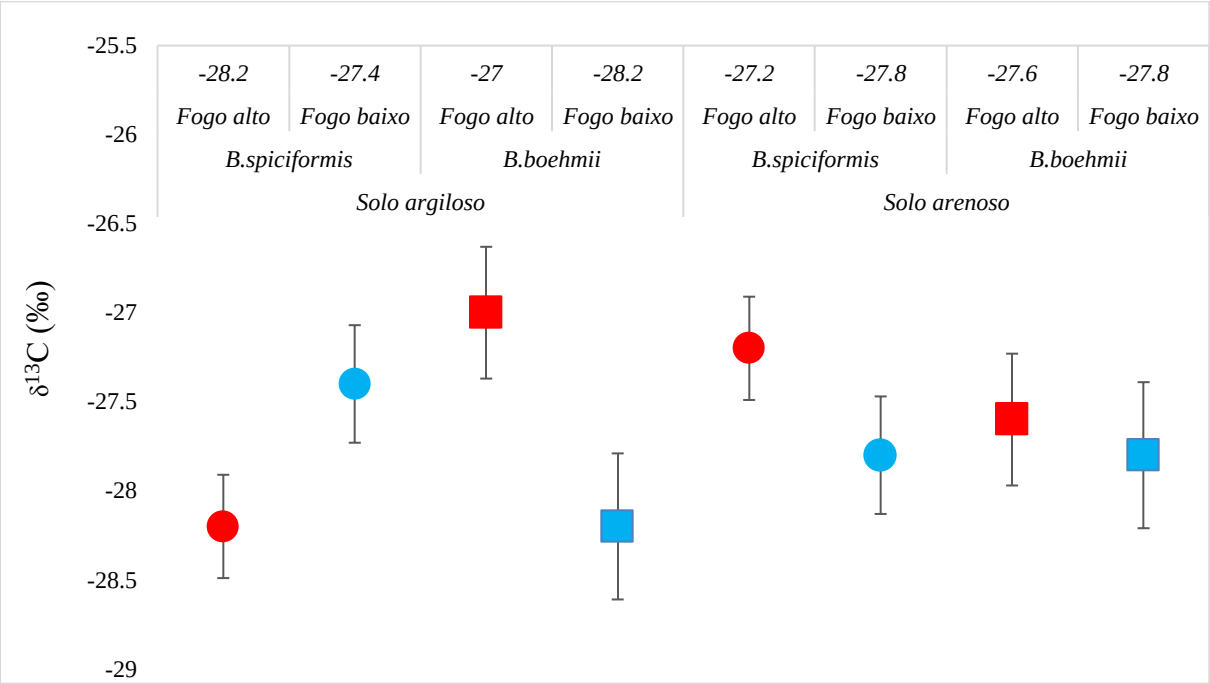

Figura 2.12: Abundância natural de $\delta^{13}C$ nos tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul baixa FF.

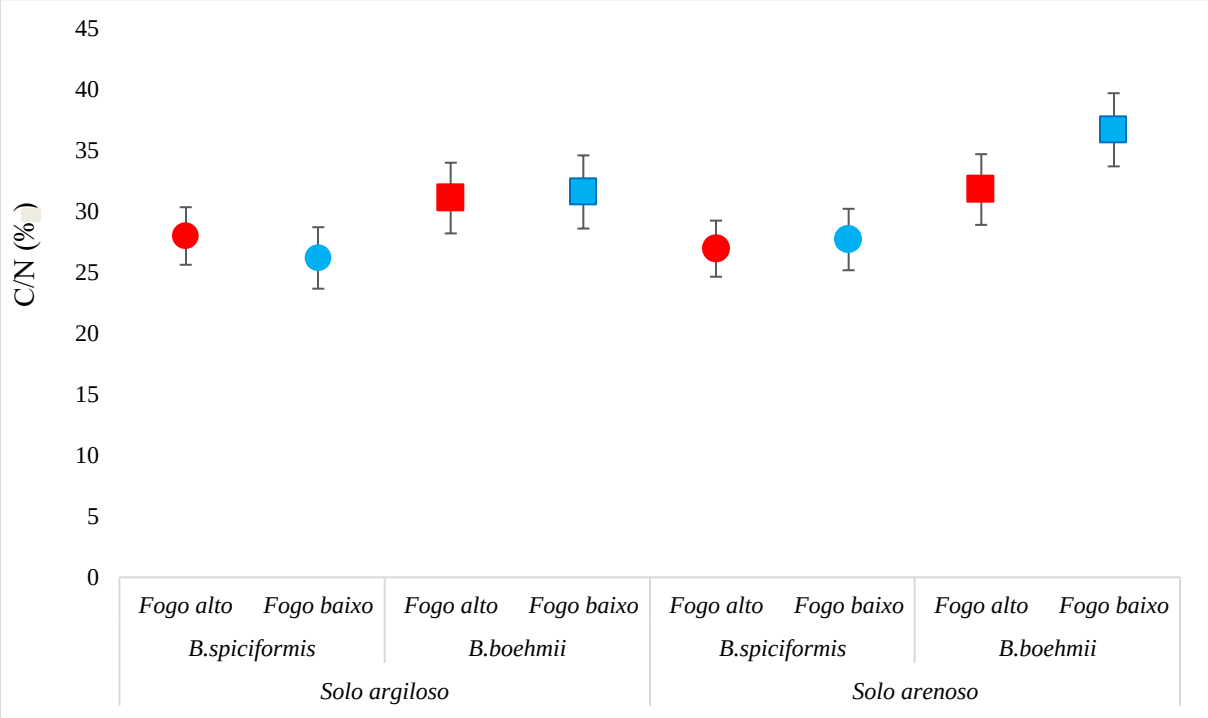

Figura 2.13: Razão isotópica entre abundância natural de %N e %C representada por C/N nos dois tipos de solo e dois regimes de fogo nas duas espécies em estudo. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado indica *B. boehmii*, o vermelho indica alta FF e o azul indica baixa FF.

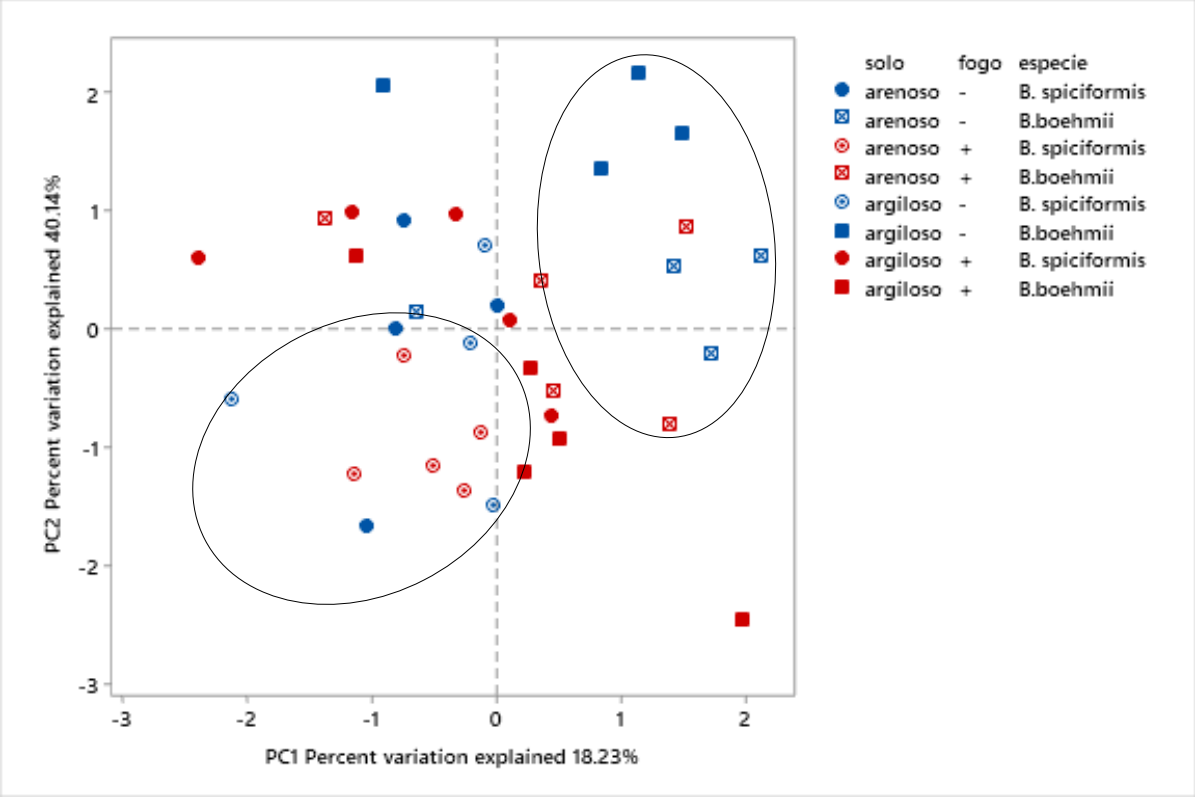

Figura 2.14: Análise de coordenadas principais, mostrando relações de similaridade entre as amostras de folhas de *B. spiciformis* e *B. boehmii* nos solos argiloso e arenoso de zonas de alta e baixa FF. O círculo indica *B. spiciformis* e o quadrado *B. boehmii*. O vermelho indica alta FF. e o azul baixa FF.

3.1. Referências bibliográficas

Adams MA, Grierson PF. 2001. Stable isotopes at natural abundance in terrestrial plant ecology and ecophysiology: an update. Plant Biology **3**:299–310.

Almeida CMR, Vasconcelos MTD. 2004. Does the winemaking process influence the wine: a case study. Food Chemistry **85**:7–12.

Alves BJR, Pozzi LZC, Boddey JRM, Urquiaga S. 2006. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e do nitrogénio no sistema solo-planta. Biotopa:343–368.

Aranibar JN, Anderson IC, Ringrose S, Macko SA. 2003. Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope studies. Journal of Arid Environments **54**:345–358.

Aranibar JN, Macko SA, Anderson IC, Potgieter ALF. 2010. Nutrient cycling responses to fire frequency in the Kruger National Park (South Africa) as indicated by stable isotope analysis. Isotopes in Environmental and Health Studies **39**:141–158.

Araujo T, De castro A, Costa M, Togawa R, Junior G, Quirino B, Mustamante M, Handelsman L, Kruger R. 2012. Characterization of soil bacterial assemblies in brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance. Microbial Ecology **62**:574–583.

Aw T, Wengert S, Rose J. 2016. Metagenomic analysis of viruses associated with field-grown and retail lettuce identifies human and animal viruses. International Journal of Food Microbiology **223,**:50–56.

Baeta A. 2018. Stable isotope ecology. Encyclopedia of Ecology, 2.ª edição. Elsevier Inc. Disponível em http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10915-7.

Ball PN, MacKenzie MD, DeLuca TH, Holben WE. 2010. Wildfire and charcoal enhance nitrification and ammonium-oxidizing bacterial abundance in dry montane forest soils. Journal of Environmental Quality **39**:1243–1253.

Barcellos TG. 2001. Efeitos do fogo sobre a fauna e a flora no cerrado. Dissertação. Centro

Universitário de Brasília. Brasila, 98 pp

Bauhus J, Khanna PK, Raison RJ. 1993. The effect of fire on carbon and nitrogen mineralization and nitrification in an australian forest soil. Australian Journal of Soil Research **31**:621–639.

Brugnoli E. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. Em: Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Kluwer Academic Publishers., Netherlands.

Bustamante MMC, L. A. Martinelli., Silva. DA, Camargo PB, C. A. Klink., Domingues TF, Santos R V. 2004. 15N Natural abundance in woody plants and soils of central brazilian savannas (Cerrado). Ecological Applications, **14**:200–213.

Campbell BM, Angelsen A, Cunningham AB, Katerere Y, Sitoe AA, Wunder S. 2007. Miombo woodlands – opportunities and barriers to sustainable forest management. Energy Policy **31**:41.

Caporaso JG, Christian L L, William AW, Donna BL, James H, Noah F, Sarah MO, Jason B, Louise F, Markus B, Niall G, Jack AG, Geoff S, Rob K. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME Journal **6**:1621–1624.

Carbonetto B, Rascovan N, Álvarez R, Mentaberry A, Vázquez MP. 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. PLoS ONE **9**:11.

Castañeda LE, Manzano M, Godoy K, Marquet PA, Barbosa O. 2015. Comparative study between soil microbial structure communities from vineyards and sclerophyllous forest in central Chile. Ecology and Evolution 5(18):3857–3868 DOI 10.1002/ece3.1652.

Castañeda LE, Barbosa O. 2017. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. PeerJ **5**:e3098.

Castro DB. 2015. Análise metagenômica da microbiota de solos de ambientes de mina de cobre

PhD Tese. Universidade Estadual de Campinas. 108pp

Cernusak LA, Tcherkez GKC, Cornwell WK, Santiago LS, Knohl A, Barbour MM, Williams DG, Reich PB, Ellsworth DS, Dawson TE, Griffiths HG, Farquhar GD, Wright IJ. 2009. Why are nonphotosynthetic tissues generally 13C enriched compared with leaves in C3 plants? Review and synthesis ofcurrent hypotheses. Functional Plant Biology **36**:199–213.

Certini G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils : a review. Oecologia **143**:1–10.

Chaer GM, Resende AS, Campello EFC, De Faria SM, Boddey RM, Schmidt S. 2011. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. Tree Physiology **31**:139–149.

Chidumayo EN. 1987. Species structure in zambian Miombo woodland. Journal of Tropical Ecology **3**:109–118.

Chidumayo EN. 2019. Forest ecology and management management implications of tree growth patterns in Miombo woodlands of Zambia. Forest Ecology and Management **436**:105–116.

Chidumayo EN, Gumbo DJ. 2010. The dry forests and woodlands of Africa: Managing for products and services. First edition, Earthscan publishers, London.

Chikaraishi Y, Ogawa NO, Doi H, Ohkouchi N. 2011. 15N/14N ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). Ecological Research **26**:835–844.

Chirwa PW, Syampungani S, Geldenhuys CJ. 2008. The ecology and management of the Miombo woodlands for sustainable livelihoods in southern Africa: The case for non-timber forest products. Southern Forests **70**:237–245.

Coletta L Della, Nardoto GB, Latansio-aidar SR, Ribeiro H, Pereira M, Aidar M, Pierre J, Balbaud H. 2009. Isotopic view of vegetation and carbon and nitrogen cycles in a cerrado ecosystem, Southeastern Brazillian Science Agriculture **66**:467–475.

Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, function, and emerging trends in microbial application **19**:29–37.

Coruzzi GM, Burga AR, Katari MS, Gutiérrez RA. 2009. Systems biology: principles and applications in plant research. Annual Plant Reviews **35**:3–40.

Craine JM, Brookshire EN, Cramer MD, Hasselquist NJ, Koba K, Marin-Spiotta E, Wang L. 2015. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. Plant Soil **396**:1–26.

Daniel R. 2005. The Metagenomics of soil. Biota **3**:470–478.

Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP. 2002. Stable isotopes in plant ecology. Annual Review of Ecology and Systematics **33**:507–559.

DeSouza O, Cancello EM. 2010. Termites and ecosystem function. Em Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Eolss Publishers, Oxford.

Devine SP, Pelletreau KN, Rumpho ME. 2012. 16S rDNA-based metagenomic analysis of bacterial diversity associated with two populations of the kleptoplastic sea slug. Biologial Bulletin **223**:138–154.

Dewees PA, Campbell BM, Katerere Y, Sitoe A, Cunningham AB, Angelsen A, Wunder S. 2010. Managing the Miombo woodlands of Southern Africa: Policies, incentives and options for the rural poor. Journal of Natural Resources Policy Research **2**:57–73.

Domingues F, Berry JA. 2006. The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon Basin , Brazil. Biogeochemistry:**2006**:24.

Dube JP, Valverde A, Steyn JM, Cowan DA, van der Waals JE. 2019. Differences in bacterial diversity, Composition and function due to long-term agriculture in soils in the Eastern Free State of South Africa. Diversity **61**:16.

Dudhagara P, Bhavsar S, Bhagat C, Ghelani A, Bhatt S, Patel R. 2015. Web resources for

metagenomics studies. Genomics, Proteomics and Bioinformatics **13**:296–303.

Duro N, Batista-Santos P, da Costa M, Maia R, Castro I V., Ramos M, Ramalho JC, Pawlowski K, Máguas C, Ribeiro-Barros A. 2016. The impact of salinity on the symbiosis between *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. and N2-fixing *Frankia* bacteria based on the analysis of nitrogen and carbon metabolism. Plant and Soil **398**:327–337.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. 2015. Base-calling of automated sequencer traces using phred . i . accuracy assessment. Genome Research **8**:175–185.

Fang Z, Fang W, Liu J. 2010. Cloning and characterization of a beta-glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. Microbiology Biotechnology **20**:1351 –1358.

Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, Campos SB, Lisboa BB, Wendisch V, Vagas LK, Passaglia LM. 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stage of canola growth. Applied soil ecology **55**:44–52.

Farquhar GD, Ehleringer JR, KH. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**:503–537.

Feng G, Xie T, Wang X, Bai J, Tang L, Zhao H, Wei W, Wang M, Zhao Y. 2018. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in Cd-contaminated soil. BMC Microbiology **18**:1–13.

Fernández-Arrojo L, Guazzaroni M., López-Cortés N, Beloqui A, Ferrer M. 2010. Metagenomic era for biocatalyst identification. Current Opinion in Biotechnology **21**:725–733.

Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, Knight R. 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. ISME Journal **6**:1007–1017.

Frost P. 1996. The ecology of Miombo woodlands. Em The Miombo in transition: woodlands and welfare in Africa. Center for International Forestry Research, Bogor, Indonensia.

Frost PGH, Robertson F. 1985. The ecological effects of fire in savannas. Em Savanna researchers. IRL Press Oxford.

Fry B. 2010. Stable isotope ecology. Encyclopedia of Ecology, 1.ª edição. Springer Science.

Ganz HH, Karaoz U, Getz WM, Versfeld W, Brodie EL. 2012. Diversity and structure of soil bacterial communities associated with vultures in an African savanna. Ecosphere **3**:19.

Ghanzafar S, Azim A, Ghanzafar MA, Anjum MI, Begum I. 2010. Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. Journal of Animal and Plant Sciences **6**:611–622.

Ghosh A, Mehta A, Khan AM. 2018. Metagenomic analysis and its applications. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology **7**:10.

Goberna M, García C, Insam H, Hernández MT, Verdú M. 2012. Burning fire-prone mediterranean shrublands: immediate changes in soil microbial community structure and ecosystem functions. Microbial Ecology **10**:85–92.

Gonzalez-Perez JA, Gonzalez-Vila F, Almedros G, Knicker H. 2004. The effect of fire on soil organic matter - a review. Environment International **30**:855–870.

Guehl JM, Domenach AM, Bereau M, Barigah TS, Casabianca H, Ferhi A, Garbaye J. 1998. Functional diversity in an amazonian rainforest of french guyana: a dual isotope approach (δ 15N and δ 13C). Oecologia **116**:16.

Gutiérrez R., Shasha D., Coruzzi G. 2005. Systems biology for the virtual plant. Plant Physiology **138**:550–554.

Habermann JM, Alemseged Z, Archer W, Bamford M, Biro D, Braun DR, Capelli CE, Ferreira M, Lüdecke T, Madiquida H, Martinez FI, Mathe J, Negash E, Paulo LM, Pinto M, Stalmans M,Tátá F, Wynn JG, Bobe R. 2019. Gorongosa by the sea: first miocene fossil sites from the urema rift, central mozambique, and their coastal paleoenvironmental and paleoecological contexts. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology **514**:723–738.

Handelsman J. 2005. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. microbiology and molecular Biology Reviews **69**:195–195.

Hellmann C, Oldeland J, Werner C. 2015. Disentangling d15N from biochemical and structural leaf properties Retrieving nitrogen isotopic signatures from fresh leaf reflectance spectra : disentangling δ 15 N from biochemical and structural leaf properties. Frontiers in Plant Science **6**:37.

Hogberg P. 1997. 15N in natural abundance in soil-plant systems. Jstor **2**:179–203.

Jaiswal SK, Dakora FD. 2019. Widespread distribution of highly adapted *Bradyrhizobium* species nodulating diverse legumes in Africa. Frontiers in Microbiology **10**:1–16.

Jaiswal SK, Msimbira LA, Dakora FD. 2017. Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. Systematic and Applied Microbiology **40**:215–226.

Jansson JK, Hofmockel KS. 2018. The soil microbiome-from metagenomics to metaphenomics. Current Opinion in Microbiology **43**:162–168.

Jebeli MA, Maleki A, Amoozegar MA, Kalantar E, Izanloo H, Gharibi F. 2017. *Bacillus flexus* strain As-12, a new arsenic transformer bacterium isolated from contaminated water resources. Chemosphere **169**:636-641.

Jew EKK, Burdekin OJ, Dougill AJ, Sallu SM. 2019. Rapid land use change threatens provisioning ecosystem services in Miombo woodlands. Natural Resources Forum **43**:56–70.

Jew EKK, Dougill AJ, Sallu SM, O'Connell J, Benton TG. 2016. Miombo woodland under threat: Consequences for tree diversity and carbon storage. Forest Ecology and Management **361**:144–153.

Jiménez Esquilín AE, Stromberger ME, Massman WJ, Frank JM, Shepperd WD. 2007. Microbial community structure and activity in a Colorado rocky mountain forest soil scarred by slash pile burning. Soil Biology and Biochemistry **39**:1111-1120.

Jimu L, Mataruse L, Musemwa L, Nyakudya IW. 2017. The Miombo ecoregion up in smoke: The effect of tobacco curing. World Development Perspectives **5**:44–46.

Jung J, Philippot L, Park W. 2016. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. Scientific Reports **6**:1–10.

Júnior GVL. 2017. Caracterização do microbioma de solos semiáridos da caatinga e seu potencial para a degradação de lignocelulose. PhD Tese. Universidade Estadual de Campinas:125pp.

Kara O, Bolat I. 2009. Short-term effects of wildfire on microbial biomass and abundance in black pine plantation soils in Turkey. Ecological Indicators **9**:1151-1155.

Kaur R, Rajesh C, Sharma R, Boparai J, Sharma P. 2018. Metagenomic investigation of bacterial diversity of hot spring soil from ecological genetics and genomics metagenomic investigation of bacterial diversity of hot spring soil from Manikaran, Himachal Pradesh, India. Ecological Genetics and Genomics **6**:16–21.

Kim E, Oh J, Chang Y. 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD y Fs and PAHs in soil. The Science of the Total Environment **311**:177–189.

Kitano H. 2002. Systems biology: a brief overview. Science **295**:1662–1664.

Kurdali F, Al-shamma M. 2015. Natural abundances of 15N and 13C in leaves of some N2-fixing and non-N2-fixing trees and shrubs in Syria. Isotopes in Environmental and Health Studies **45**:198–207.

Lambais R, Cury J, Bareta C, Bull R. 2005. Diversidade microbiana em solos. Archaea **4**:43–84.

Lan G, Li Y, Jatoi MT, Tan Z, Wu Z, Xie G. 2017. Change in soil microbial community compositions and diversity following the conversion of tropical forest to rubber plantations in Xishuangbanan , Southwest China. Tropical Conservation Science 10:1–14.

Landwehr W, Kämpfer P, Glaeser SP, Rückert C, Kalinowski J, Blom J, Goesmann A, Mack M, Schumann P, Atasayar E, Hahnke RL, Rohde M, Martin K, Stadler M, Wink J. 2018). Taxonomic analyses of members of the *Streptomyces cinnabarinus* cluster, description of *Streptomyces cinnabarigriseus* sp. nov. and *Streptomyces davaonensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **68**:382–393.

Leavitt SW, Long A. 1986. Stable-carbon isotope variability in tree foliage and wood. Ecology **67**:1002–1010.

Lira GTR. 2012. Diversidade em comunidades bacterianas de solos de matas de galeria do Cerrado. Dissertação. Universidade de Brasilia:85pp.

Lupala ZJ, Lusambo LP, Ngaga YM. 2014. Management, growth, and carbon storage in Miombo woodlands of Tanzania. International Journal of Forestry Research **2014**:629317.

Lupala ZJ, Lusambo LP, Ngaga YM, Makatta AA. 2015. The land use and cover Change in Miombo woodlands under community based forest management and its implication to climate change mitigation: a case of southern highlands of Tanzania. International Journal of Forestry Research **2015**:459102.

Makhado, RA, Mapaure I, Potgieter MJ, Luus-Powell WJ, Saidi AT. 2014. Factors Influencing the adaptation and distribution of *Colophospermum Mopane* in southern Africa's Mopane savannas – a review. Bothalia **44**:1–9.

Makonda FBS, Gillah PR. 2007. Balancing wood and non-wood products in mi-ombo woodlands. mitMiombo--management of indigenous tree species for ecosystem restoration and wood production in semi-arid Miombo woodlands in Eastern Africa. Proceedings of the First Miombo project workshop:6–12.

Malaisse F. 2018. Termites and termites mounds - some selected observations. Bull. Séanc. Acad. R. Sci. Outre-Mer **6**:35.

Malmer A. 2007. General ecological features of Miombo woodlands and considerations for

utilization and management. Forest Research Institute **50**: 34–42

Mandakovic D, Maldonado J, Pulgar R, Cabrera P, Gaete A, Urtuvia V, Seeger M, Cambiazo V, González M. 2018. Microbiome analysis and bacterial isolation from Lejía Lake soil in Atacama Desert. Extremophiles **22**:665–673.

Mapaure I, Moe SR. 2009. Changes in the structure and composition of Miombo woodlands mediated by elephants (Loxodonta africana) and fire over a 26 - year period in north - western Zimbabwe changes in the structure and composition of Miombo woodlands mediated by elephants (Lox. Afr. J. Ecol. **47**:175–183.

Maquia I, Ribeiro NS, Silva V, Bessa F, Goulao LF, Ribeiro AI. 2013. Genetic diversity of *Brachystegia boehmii* Taub. and *Burkea africana* Hook. f. across a fire gradient in Niassa National. Biochemical Systematics and Ecology **48**:238–247.

Maquia I, Silvia C, Pena A, Brito D, Ribeiro NS, Romeiras MM, Ribeiro-barros AI. 2019. Diversification of african tree legumes in Miombo–mopane woodlands. Plants **8**:182.

Mardegan SF. 2007. Abundância natural de 15N em solos e folhas de áreas de campina e campinarana da reserva biológica da campina – inpa, região de Manaus, Amazonas. PhD Tese.Universidade Federal de Amazonas.125pp.

Martinelli LA, Piccolo MC, Townsend AR, Vitousek PM, Cuevas E, McDowell W, Robertson GP, Santos OC, Treseder K. 1999. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: tropical versus temperate forests. Biogeochemistry **46**:45–65.

Marzoli A. 2007. Inventário florestal nacional. Relatório Final.

Mataix-Solera J, Guerrero C, García-Orenes F, Bárcenas G, Torres M. 2009. Forest fire effects on soil microbiology. Fire Effects on Soils and Restoration Strategies **5**:133–175.

Mbanze AA, Martins AM, Rivaes R, Ribeiro-Barros AI, Ribeiro NS. 2019. Vegetation structure and effect of human use of the dambos ecossystem in northen Mozambique. Global Ecology and Conservation **20**:e00704 .

Mbanze AA, Martins AM, Rivaes R, Ribeiro-Barros AI, Ribeiro NS. 2019. Field data on vegetation structure and effect of human use of the dambos ecossystem in northen Mozambique. Data in brief **26**:104454.

Mendes LW. 2014. Metagenome of Amazon forest conversion: impacts on soil-borne microbial diversity and functions. Dissertação.Universidade de Sao Paulo:126pp.

Meneghine AK. 2016. Análise metagenômica e potencial biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica. PhD Tese.Universidade Estadual Paulista:129 pp.

Meneghine AK, Nielsen S, Varani AM, Thomas T, Alves LMC. 2017. Metagenomic analysis of soil and freshwater from zoo agricultural area with organic fertilization. PLoS ONE **12**-98

Meyer F. 2013. Metagenome analysis with MG- RAST. BMC Bioinformatics **2**:28

Mittermeier RA, Mittermeier CG, Brooks TM, Pilgrim JD, Konstant WR, Fonseca GAB da, Kormos C. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. Journal for Nature Conservation **18**:338–339.

Molina-Montenegro M, Ballesteros G, Castro-Nallar E, Meneses C, Gallardo-Cerda J. 2018. Metagenomic exploration of soils microbial communities associated to Antarctic vascular plants. PeerJ Preprints: 54774585.

Moura I, Maquia I, Rija AA, Ribeiro N, Ribeiro-Barros AI. 2018. Biodiversity studies in key species from the african mopane and Miombo woodlands. Em Genetic Diversity. Intech open.

Mwakalukwa E, Meilby H, Treue T. 2014. Volume and aboveground biomass models for dry Miombo woodlands in Tanzania. International Journal of Forestry Research **24**: 531256.

Nardoto GB. 2005. Abundância natural de 15 N na Amazônia e Cerrado – implicações para a ciclagem de nitrogénio. Dissertação.Universidade de São Paulo:78pp.

Neilson J, Quade W, Ortiz J, Nelson M, Legatzki WM, Tian F. 2012. Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama desert, Chile. Extremophiles **16**:553–

566.

Nkuekam GK, Cowan DA, Valverde A. 2018. Arable agriculture changes soil microbial communities in the South African Grassland Biome. South African Journal of Science **114**:1–7.

Nowak M, Koegler F. 2018. Determination of N_2 and N_2O fixation rates in leguminous plants and three different soil types by labeling experiments with stable nitrogen isotopes. ISME **11**: 1–13.

Numan M, Bashir S, Khan Y, Mumtaz R. 2018. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. Microbiological Research **209**:21–32.

Ometto J, Ehleringer J, Dominguez AT, Berry J, Mazzi I, Higuchi N, Flanangan L, Nardoto G, Martinelli L. 2006. The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon Basin , Brazil. Biogeochemistry **4**:24.

Pereira AL, Benedito E. 2007. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. Revista Biociências **13**:16–27.

Pereira P, Francos M, Brevik EC, Ubeda X, Bogunovic I. 2018. Post-fire soil management. Current Opinion in Environmental Science and Health **5**:26–32.

Pereira RM, Da Silveira ÉL, Carareto-Alves LM, De Macedo Lemos EG. 2008. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. Revista Brasileira de Ciência do Solo **32**:1921–1927.

Perkins MJ, McDonald RA, Van Veen FJF, Kelly SD, Rees G, Bearhop S. 2014. Application of nitrogen and carbon stable isotopes (δ15N and δ13C) to quantify food chain length and trophic structure. PLoS ONE **9**:10.

Pickford M. 2012. Moçambique Palaeontology Reconnaissance. 75005.

Pinho D. 2012. O Microbioma do solo : influência do estado fitossanitário do sobreiro. PhD

Tese. Universidade de Aveiro:128 pp.

Raison RJ. 1979. Modification of the soil environment by vegetation fires, with particular reference to nitrogen transformations: a review. Plant and Soil **108**:73–108.

Ramos RF, Sobucki L, Rohrig B, Ludwig J, Daroit DJ. 2018. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho cultivation. Revista de Ciências Agroveterinárias **17**:417–427.

Rascher KG, Hellmann C, Máguas C, Werner C. 2012. Community scale 15N isoscapes: tracing the spatial impact of an exotic N_2-fixing invader. Ecology Letters **15**:484–491.

Rascovan N, Carbonetto B, Revale S,Reinert MD, Alvarez R, Godeas A, Colombo R, Aguilar M Novas MV, Iannone L, Zelada AM, Pardo A, Schrauf G, Mentaberry, Alejandro, Vasquez MP. 2013. The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. Microbiome **1**:1–6.

Redin M, de Franceschi dos Santos G, Miguel P, Luís Denega G, Lupatini M, Doneda A, Lorensi de Souza E. 2011. Impactos da queima sobre atributos químicos, físicos e biológicos do solo. Ciência Florestal **21**:381–392.

Řeháková K, Chroňáková A, Krištufek V, Kuchtová B, Čapková K, Scharfen J, Čapek P, Doležal J. 2015. Bacterial community of cushion plant thylacospermum ceaspitosum on elevational gradient in the himalayan cold desert. Frontiers in Microbiology **6**:1–16.

Ribeiro-Barros AI, Silva MJ, Moura I, Ramalho JC, Máguas-Hanson C, Ribeiro NS. 2018. The potential of tree and shrub legumes in agroforestry systems. Nitrogen in agriculture - Updates. Intech open.

Ribeiro NS, Cangela A, Bandeira RR, Ribeiro-Barros AI. 2017. Characterization of spatial and temporal distribuition of the fire regime in Niassa National reserve, northen Mozambique. International Journal of Wildland Fire **26:**1021-1029.

Ribeiro N, Sitoe AA, Guedes BS, Staiss C. 2002. Manual de silvicultura tropical. Universidade

Eduardo Mondlane, Maputo.

Ribeiro NS, Matos CN, Moura IR, Washington-Allen RA, Ribeiro AI. 2013. Monitoring vegetation dynamics and carbon stock density in Miombo woodlands. Carbon Balance and Management **8**:11.

Ribeiro NS, Saatchi SS, Shugart HH. 2008a. Aboveground biomass and Leaf Area Index (LAI) mapping for Niassa Reserve, northern Mozambique. Journal of Geophysical Research **113**:12.

Ribeiro NS, Shugart HH, Washington-Allen R. 2008b. The effects of fire and elephants on species composition and structure of the Niassa Reserve , northern Mozambique. Forest Ecology and Management **255**:1626–1636.

Ribeiro NS, Snook LK, Vaz ICN de C, Alves T. 2019. Gathering honey from wild and traditional hives in the Miombo woodlands of the Niassa National Reserve , Mozambique: What are the impacts on tree populations. Global Ecology and Conservation **17**:14.

Ribeiro NS, Syampungani S, Matakala NM, Nangoma D, Ribeiro-barros AI. 2015. Miombo woodlands research towards the sustainable use of ecosystem services in Southern Africa. Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function 474–490.

Ribeiro T, Loureiro J, Santos C, Morais-Cecílio L. 2011. Evolution of rDNA FISH patterns in the Fagaceae. Tree Genetics and Genomes **7**:1113–1122.

Ribeiro V, Ribeiro DL. 2008. Forests and the biodiversity convention independent monitoring of the implementation of the expanded programme of work in mozambique. 32 Country monitoring report on Mozambique.

Rilling JI, Acuña JJ, Nannipieri P, Cassan F, Maruyama F, Jorquera MA. 2019. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth – promoting bacteria. Soil Biology and Biochemistry **130**:205–219.

Robinson D, Handley LL, Scrimgeour CM, Gordon DC, Forster BP, Ellis RP. 2000. Using stable

isotope natural abundances (δ15N and δ13C) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch.) genotypes. Journal of Experimental Botany **51**:41–50.

Rodrigues C, Maia R, Miranda M, Ribeirinho M, Nogueira JM., Maguas C. 2009. Stable isotope analysis for green coffee bean : a possible method for geographic origin discrimination. Journal of Food Composition and Analys **22**:463–471.

Rodrigues TB. 2011. Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos. Tese PhD. Universidade Federal de Rio de Janeiro:269pp.

Rodríguez J, Turmero A, González-Pérez JA, González-Vila FJ, Arbelo C, Rodríguez-Rodríguez A, Pérez-Leblic MI, Arias ME. 2013. Effect of wildfires on the genetic microbial diversity in forest soils from Canary Islands (Spain). Flamma **5**:42–44.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ **2584**:1–22.

Rughöft S, Herrmann M, Lazar CS, Cesarz S. 2016. Community composition and abundance of bacterial, archaeal and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. Frontiers in Microbiology **7**:1–16.

Ryan CM. 2009.Carbon cycling, fire and phenology in a tropical savanna woodland in Nhambita, Mozambique. PhD thesis. University of Edinburgh:257 pp.

Ryan CM, Berry NJ, Joshi N. 2014. Quantifying the causes of deforestation and degradation and creating transparent REDD+ baselines: a method and case study from central Mozambique. Applied Geography **53**:45–54.

Ryan CM, William M, Grace J. 2011a. Above- and belowground carbon stocks in a Miombo wooodland landscape of Mozambique. Biotropica **43**:423–432.

Ryan CM, Williams M. 2011b. How does fire intensity and frequency affect Miombo woodland tree populations and biomass? Ecological Applications **21**:48–60.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger, GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology **75**:7537–7541.

Schloss PD, Handelsman J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. Genome Biology **6**:6–9.

Serrano-Silva N, Calderón-Ezquerro MC. 2018. Metagenomic survey of bacterial diversity in the atmosphere of Mexico City using different sampling methods. Environmental Pollution **235**:20-29.

Smith NR, Kishchuk BE, Mohn WW. 2008. Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology **74**:216–224.

Stalmans M, Brilfudd R. 2008. Landscapes of the Gorongosa National Park. Technical Report.

Stalmans ME, Massad TJ, Peel MJS, Tarnita CE, Pringle RM. 2019. War-induced collapse and asymmetric recovery of large-mammal populations in Gorongosa National Park, Mozambique. PLoS ONE **14**:1–18.

Swap RJ, Aranibar JN, Dowty P., Macko SA. 2004. Natural abundance of 13C and 15N in C3 and C4 vegetation of southern Africa : patterns and implications. Global Change Biology **10**:350–358.

Taş N, Prestat E, McFarland JW, Wickland KP, Knight R, Berhe AA, Jorgenson T, Waldrop MP, Jansson JK. 2014. Impact of fire on active layer and permafrost microbial communities and metagenomes in an upland Alaskan boreal forest. ISME Journal **8**:1904–1919.

Techo S, Miyashita M, Shibata C, Wisetkhan P, Visessanguan W, Tanasupawat S. 2016. *Lactobacillus ixorae* sp. nov., isolated from a flower (West-Indian jasmine). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **66**:5500-5505.

Teixeira H, Rodríguez-echeverría S. 2016. Identification of symbiotic nitrogen-fixing bacteria from three African leguminous trees in Gorongosa National Park. Systematic and Applied Microbiology **39**:9.

Telles, ECC, Camargo PB, Martinelli LA, Trumbore SE, Costa ES, Higuchi N, Oliveira RC. 2003. Influence of soil texture on carbon dynamics and storage potential in tropical forest soils of Amazonia. Global Biogeochemical Cycles **17**:1029-1045.

Timberlake J, Chidumayo E. 2011. Miombo ecoregion vision report. Biodiversity **3**:80.

Tinley KL. 1977. Framework of the Gorongosa ecossystem. PhD Tese. University of Pretoria:325pp

Tipper R, Garret W. 2008. Conservation of Miombo woodland in Mozambique. Edinburgh Centre for Carbon Management, Edinburgh.

Tobin TC, Janzen CP. 2008. Scholarly commons microbial communities in fire-impacted soils. Soil Biology Microbiology of Extreme Soils **13**:299–316.

Tsurumaru H Okubo T,Okazaki K,Hashimoto M,Kakizaki K Hanzawa E,Takahashi H,Asanome N,Tanaka F, Sekiyama Y, IkedaS, Minamisawa K. 2015. Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. Microbes and environments **30**:63–69.

Uroz S, Ioannidis P, Lengelle J, Cébron A, Morin E, Buée M, Martin F. 2013. Functional assays and metagenomic analyses reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a norway spruce plantation. PLoS ONE **8**:13.

Viana LT, Bustamante MM da C, Molina M, Pinto A de S, Kisselle K, Zepp R, Burke RA. 2011. Microbial communities in cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. Pesquisa Agropecuaria Brasileira **46**:1665–1672.

Voronin PY, Mukhin VA, Velivetskaya TA, Ignat'ev A V., Kuznetsov V V. 2017. Isotope composition of carbon and nitrogen in tissues and organs of Betula pendula. Russian

Journal of Plant Physiology **64**:184–189.

Wang L, Odorico PD, Okin GS, Macko SA. 2009. Isotope composition and anion chemistry of soil profiles along the Kalahari Transect. Journal of Arid Environments **73**:480–486.

Wei H, Changhui P, Bin Y, Hanxiong S, Quan L, Lin J,Gang W, Kefeng W, Hui W, Shirong L, Xiaojing L, Dexiang C, Meng W. 2018. Contrasting soil bacterial community, diversity, and function in two forests in China. Frontiers in Microbiology **9**:14.

Werner C, Máguas C. 2010. Carbon isotope discrimination as a tracer of functional traits in a Mediterranean macchia plant community. Functional Plant Biology **37**:467–477.

Whitman T, Whitman E, Woolet J, Flannigan MD, Thompson DK, Parisien M. 2019. Soil bacterial and fungal response to wild fires in the Canadian boreal forest across a burn severity gradient. Soil Biology and Biochemistry **138**:13.

Wilke A, Gerlach W, Harrison T, Paczian T, Trimble WL, Meyer F. 2017. MG-RAST manual for version 4 , 1.ª edição. Chicago.

Wilson EO. 2004. A window on eternity: a biologist walk through Gorongosa National Park, 1.ª edição. Simon & Schuster, London.

Wolińska A, Kuźniar A, Zielenkiewicz U, Banach A, Izak D, Stępniewska Z, Błaszczyk M. 2017. Metagenomic analysis of some potential nitrogen-fixing bacteria in arable soils at different formation processes. Microbial Ecology **73**:162–176.

Yoneyama T, Muraoka T, Murakami T, Boonkerd N. 1993. Natural abundance of on tree legumes in tropical plants with emphasis on tree legumes. Plant and Soil **153**:295–304.

Zengeni R, Kakembo V. 2017. 13C and 15N isotope ratios in Leptosols of thicket ecosystems in South Africa Geoderma Regional C and 15 N isotope **11**:113–122.

Zhou L, Ng HK, Drautz-moses DI, Schuster SC, Beck S, Kim C, Chambers JC, Loh M. 2019. Systematic evaluation of library preparation methods and sequencing platforms for high-

throughput whole genome bisulfite sequencing. Nature **9**:1–16.

Zolho R. 2005. Effect of fire frequency on the regeneration of Miombo woodlands in Nhambita, Mozambique. PhD Thesis. University of Edinburgh:71pp

Apêndices

Apêndice 1: Controlo de qualidade de amostras de DNA do solo

Amostras	Total Bases	Read Count	N (%)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
SBBP001	99.655.142	219.839	0	57.58	97.38	90.62
SBBP002	107.734.810	236.512	0	57.64	97.25	90.25
SBBP003	99.443.763	218.438	0	57.78	97.35	90.42
SBBP006	99.102.894	217.796	0	57.43	97.33	90.49
SBBP007	89.702.471	197.247	0	57.16	97.53	90.83
SBBP008	87.016.503	191.400	0	57.54	97.48	90.8
SBBP011	95.090.206	208.870	0	56.93	97.54	91.15
SBBP012	92.241.797	205.388	0	57.56	97.57	91.1
SBBP013	100.966.144	222.433	0	57.36	97.5	90.91
SBBP016	89.591.127	197.165	0	57.17	97.39	90.6
SBBP017	97.890.593	215.237	0	57.54	97.52	90.93
SBBP018	97.160.430	213.993	0	57.9	97.43	90.61
SBSP001	91.306.056	200.782	0	57.24	97.55	91.02
SBSP002	94.859.771	208.460	0	56.95	97.45	90.76
SBSP003	97.966.413	215.555	0	57.83	97.47	90.77
SBSP006	103.437.817	227.661	0	57.33	97.49	90.91
SBSP007	96.179.736	211.279	0	57.68	97.36	90.56
SBSP008	93.502.194	206.270	0	57.32	97.22	90.13
SBSP011	100.986.457	223.419	0	57.26	97.63	91.13
SBSP012	90.737.076	200.357	0	57.19	97.39	90.65
SBSP013	90.806.816	200.893	0	55.26	97.65	91.4
SBSP016	90.748.702	200.082	0	57.42	97.48	90.83
SBSP017	97.147.660	216.018	0	56.96	97.61	91.33
SBSP018	104.186.032	229.401	0	57.75	97.47	90.89

Apêndice 2: Índices de diversidade da comunidade

Amostras	OTUs	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
SBBP001	841	1101.04	7.57	0.98
SBBP002	1288	1588.6	8.10	0.98
SBBP003	1098	1296.34	7.93	0.98
SBBP006	1180	1499.53	7.73	0.98
SBBP007	1044	1226.96	7.844	0.98
SBBP008	1033	1263.65	7.01	0.96
SBBP011	882	1186.77	5.03	0.84
SBBP012	602	710.32	6.16	0.93
SBBP013	1081	1277.91	7.66	0.98
SBBP016	984	1361.16	6.92	0.96
SBBP017	1218	1421.57	8.15	0.98
SBBP018	913	1069.12	7.26	0.98
SBSP001	1169	1395.6	8.24	0.99
SBSP002	1162	1428.47	7.82	0.98
SBSP003	1100	1365.58	7.57	0.98
SBSP006	1071	1277.35	7.48	0.98
SBSP007	1128	1350.33	7.95	0.98
SBSP008	1051	1403	7.43	0.97
SBSP011	1070	1337.97	6.94	0.95
SBSP012	966	1160.19	7.06	0.97
SBSP013	649	810.5	4.26	0.73
SBSP016	1186	1468.74	8.06	0.98
SBSP017	902	1083.87	7.05	0.97
SBSP018	1129	1354.14	8.025	0.98

Apêndice 3: Análise de variância nos dois regimes de fogo (alta e baixa) em solos argilosos e arenosos para a espécie em estudo *B. spiciformis* e *B. boehmii*

	F	**df**	**P**
Espécie	0.09	5	0.99
Solo	0.95	5	0.46
Fogo	1.67	5	0.17
Espécie*Solo	0.09	5	0.99
Espécie*fogo	0.09	5	0.99
Solo*fogo	3.43	5	0.01
Espécie*Solo*fogo	0.09	5	0.99