

Nathielly Pires Martins

## **Alterações nos mecanismos de aquisição de nutrientes em uma floresta na Amazônia Central: uma resposta ao aumento de CO<sub>2</sub> na atmosfera**

**Bolsa solicitada: Nível doutorado**

**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais**

Nathielly Pires Martins

Mestre em Ciências de Florestas Tropicais

Currículo lattes disponível em: <http://lattes.cnpq.br/1130541034053558>

INPA - V8. Aleixo, Manaus – AM, 69055-010, Brasil.

Carlos Alberto Nobre Quesada

Doutor, pesquisador associado III.

Ativo permanente.

Currículo lattes disponível em: <http://lattes.cnpq.br/4577313463547926>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Dinâmica Ambiental.

Avenida Efigênio Salles 2239 – Aleixo. CEP: 69000000 - Manaus, AM – Brasil

### **Introdução e Justificativa**

A floresta amazônica corresponde à maior extensão contínua de florestas tropicais do mundo, representando um estoque de carbono (C) de, aproximadamente, 150 a 200 Pg (Feldpausch et al. 2012). Uma possível redução na capacidade de armazenar C em sua biomassa poderia influenciar de forma significativa as mudanças ambientais e, conseqüentemente, as mudanças climáticas globais (Hofhansl et al. 2016). O aumento na temperatura média global e redução nos regimes de precipitação caracterizam as principais alterações decorrentes das mudanças climáticas. Se estas mudanças forem confirmadas nas próximas décadas, o efeito na estrutura da floresta amazônica poderá ser catastrófico (Malhi et al. 2009, Hirota 2011).

Um dos principais fatores que impulsiona essas alterações no clima global está relacionado com o aumento exponencial na concentração atmosférica de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) desde a Revolução Industrial (IPCC 2014). No entanto, o aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico pode ser também o fator determinante para a resiliência das florestas tropicais no contexto de

alterações nas condições climáticas, visto que o CO<sub>2</sub> é o substrato básico para a fotossíntese. Assim, com maiores concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera, um estímulo na capacidade fotossintética poderá ocorrer, acompanhada de uma menor abertura dos estômatos. A possibilidade de aumentar a atividade fotossintética com uma menor abertura estomática promove uma maior eficiência no uso da água (Cernusak et al. 2013). A eficiência no uso da água pode ser definida como a quantidade de C adquirido por unidade de água perdida a longo prazo (Ainsworth and Rogers 2007). Nesse sentido, as plantas poderiam realizar a mesma ou até mesmo uma atividade fotossintética superior perdendo uma menor quantidade de água via transpiração, aumentando a sua resiliência as secas.

O estímulo dos processos citados anteriormente pode resultar em um aumento na produtividade florestal e acúmulo de biomassa, fenômeno conhecido como “efeito de fertilização por CO<sub>2</sub>”. Existem algumas possibilidades de avaliar como os ecossistemas florestais respondem ao aumento de CO<sub>2</sub> na atmosfera (eCO<sub>2</sub>). A principal delas é por meio da utilização de uma tecnologia conhecida como “FACE” (*Free-Air CO<sub>2</sub> Enrichment* – Enriquecimento de CO<sub>2</sub> ao Ar Livre). Outra possibilidade refere-se à mesma técnica, porém em uma escala menor, na qual são utilizadas câmaras de enriquecimento de CO<sub>2</sub> (*Open-Top Chamber, OTC*) (Leadley and Drake 1993).

Ambas as tecnologias mencionadas já provaram ser métodos válidos para determinar as respostas de curto e longo prazo dos ecossistemas florestais ao aumento de CO<sub>2</sub>, principalmente em regiões temperadas. Norby et al. (2005) observaram um aumento na produtividade florestal sob condições de eCO<sub>2</sub>, no entanto, o incremento na produtividade estagna após alguns anos, devido à limitação de nitrogênio no solo (Norby et al. 2010). A principal alternativa das plantas para superar a limitação nutricional está relacionada com a maior alocação de C para abaixo do solo (Norby et al. 2010), sobretudo através do aumento na produtividade de raízes finas (Norby et al. 2004, Iversen et al. 2008). Simultaneamente a este processo, pode ocorrer também um pulso na exsudação de compostos de C lábil (Phillips et al. 2012). Esse pulso de energia (carbono lábil) pode estimular a procura microbiana por nutrientes, que pode ser atingida pelo aumento na síntese de enzimas extracelulares. Elas são responsáveis por realizar a despolimerização dos elementos presentes na serapilheira ou matéria orgânica do solo (Cheng and Kuzyakov 2005), liberando os nutrientes em uma forma que podem ser utilizados pelas plantas (inorgânica). Nesse cenário há um feedback positivo, entre o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera e a produtividade primária líquida das florestas, e conseqüentemente uma maior resiliência desses ecossistemas a alterações climáticas.

Grande parte dos experimentos citados anteriormente sobre o efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> nos ecossistemas florestais foram realizados em florestas temperadas. Uma das principais diferenças entre os ecossistemas tropicais e os temperados está relacionada com a fertilidade do solo, onde os solos de regiões tropicais apresentam alto nível de desenvolvimento pedogenético, caracterizado por fortes taxas de intemperismo e, portanto, baixa disponibilidade dos nutrientes originados de rochas, sendo o fósforo (P) o principal deles (Quesada et al. 2010). Nesse sentido, como os ciclos de N e P são diferentes, as respostas em relação ao efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> podem apresentar grandes diferenças (Lloyd et al. 2007).

Nós partimos do pressuposto de que a eficiência do efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> para a resiliência das florestas deve ser simultaneamente acompanhada com uma maior disponibilidade de nutrientes. Assim, é essencial quantificar a alocação de C abaixo do solo e determinar se o possível aumento na disponibilidade de carboidratos sintetizados na fotossíntese, em função do efeito de fertilização por CO<sub>2</sub>, pode ser usado para adquirir mais nutrientes. Além disso, como já descrito anteriormente o aumento na disponibilidade de C lábil pode estimular processos importantes para a aquisição de nutrientes (Kuzyakov et al. 2000, Kuzyakov 2010), como por exemplo, a atividade dos microrganismos expressa principalmente através da atividade das enzimas extracelulares e imobilização de nutrientes em sua biomassa. Outro mecanismo que pode ser essencial para as florestas tropicais é a ação direta das raízes finas atuando na liberação de P através da exsudação de enzimas fosfatases ou exsudação de ácidos orgânicos.

Através da literatura construída ao longo de décadas sobre o efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> para os ecossistemas temperados nós podemos deduzir alguns processos e mecanismos chaves que podem ser alterados nas florestas tropicais. Porém, ressaltamos a grande diversidade de espécies arbóreas, tipos de solo e variações climáticas encontradas nos ecossistemas tropicais. Tais condições podem influenciar de diferentes formas as respostas ao efeito de fertilização por CO<sub>2</sub>, tornando essencial a realização de experimentos que avaliem diretamente esse efeito na dinâmica dos ecossistemas tropicais. Além disso, qualquer estímulo na produtividade das florestas tropicais em cenários de aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico será controlado pela quantidade de nutrientes disponíveis nos solos, entender como plantas e microrganismos adquirem e usam determinados nutrientes se torna crucial na predição do exato papel que florestas Amazônicas desempenharão em cenários futuros de mudanças climáticas, afetando a vida de milhões de pessoas que direta ou indiretamente dependem do funcionamento desse ecossistema. Diante disto, esta proposta visa entender os efeitos da interação entre

nutrientes do solo e aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico afetando o funcionamento de uma floresta da Amazônia central.

### **Objetivo geral**

Avaliar se o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera irá promover alterações nos principais mecanismos que controlam a aquisição de nutrientes na Amazônia Central.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar se o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera irá promover alterações nos principais mecanismos que controlam a aquisição de nutrientes na Amazônia Central.
2. Avaliar como o aumento de CO<sub>2</sub> influencia os processos enzimáticos responsáveis por promover a decomposição da serapilheira e dinâmica de nutrientes.
3. Analisar possíveis alterações do aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na dinâmica de nutrientes em diferentes profundidades do solo.

### **Metodologias utilizadas**

#### **Objetivo específico 1**

Para determinar se o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera resultará em uma maior alocação de C para as raízes em busca de nutrientes, será monitorada a dinâmica das raízes finas na camada da serapilheira e em diferentes profundidades do solo. Inicialmente será determinado o estoque inicial de raízes presentes na serapilheira através da coleta das folhas e raízes em uma área de, aproximadamente, 15 x 15 cm. Em seguida, na mesma área em que foi coletado o estoque inicial, serão instaladas armadilhas de raízes superficiais. Será adicionado em média a mesma quantidade de folhas (serapilheira retirada) dentro das armadilhas, onde as raízes irão crescer. Já para o estoque inicial das raízes finas presente no solo, serão coletadas amostras de solos em um diâmetro aproximado de 12,5 cm para as camadas de 0 a 5 cm e 5 a 15 cm de profundidade. Posteriormente, no mesmo local, serão instalados *ingrowth cores* (armadilhas de raízes - solo) com diâmetro de 10 cm e profundidade de 15 cm. Assim como descrito para a serapilheira, será adicionado solo já triado (sem raízes) dentro *dos ingrowth cores* para monitorar o crescimento das raízes. No total serão instaladas 8 armadilhas de raízes na serapilheira e 8 armadilhas de raízes no solo nas câmaras de topo aberto referentes ao controle (Concentração de CO<sub>2</sub> ambiente). Além disso, serão instaladas a mesma quantidade de

armadilhas em câmaras de topo aberto que serão submetidos ao aumento na concentração de CO<sub>2</sub> (+ 200 ppm em relação a concentração de CO<sub>2</sub> da câmara controle).

Em intervalos regulares de três meses será realizada a coleta de ambas as armadilhas, possibilitando quantificar a produtividade das raízes finas nos dois compartimentos descritos. Após cada coleta, as amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Ciclos Biogeoquímicos (INPA).

Já em laboratório, todas as raízes finas serão limpas e classificadas nas seguintes classes de diâmetro: (<1 mm; >1 e <2 mm; > 2mm). Serão retiradas sub amostras de cada amostra das raízes da classe <1 mm para determinar a potencial atividade da fosfatase e percentual de colonização por micorrizas arbusculares, cujas estratégias de aquisição de nutrientes poderão ser alteradas sob eCO<sub>2</sub>. Em seguida, o restante das amostras da mesma classe (<1 mm) serão digitalizadas em um scanner de mesa (EPSON Perfection V700Photo) com resolução de 600 dpi para cálculo dos parâmetros morfológicos. Os parâmetros morfológicos avaliados serão comprimento específico da raiz (SRL), área específica da raiz (SRA), densidade do tecido radicular (RTD) e diâmetro médio da raiz. O SRL (cm g<sup>-1</sup>) será calculado como o comprimento por unidade de massa seca; SRA (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) será calculada como área superficial da raiz por unidade de massa seca; o RTD (g cm<sup>-3</sup>) será calculado como massa seca da raiz por volume de raiz unitária. As análises serão realizadas com o auxílio do software WinRHIZO (WinRHIZO Regular, Regent Instruments, Canadá). Para determinar a biomassa, todas as raízes de ambas as classes de diâmetro serão secas em estufa a 65 °C por 72 horas.

Para determinação da potencial atividade da fosfatase (como descrito acima) será utilizado adaptações do protocolo sugerido por (Lugli et al. 2019). Será pesado 2 alíquotas de aproximadamente 10 mg de raízes frescas de cada amostra em microtubos de 2 mL. Para preparação da amostra (alíquota 1) será adicionado 1 ml de *buffer* e 0,25 l de *MUF-phosphate* (2 mM), já para as amostras controle (alíquota 2), será adicionado 1,25 ml de *buffer*. Todas as amostras serão incubadas durante 30 min a 25° C, enquanto são agitadas (agitador horizontal de velocidade). Paralelamente, serão preparadas as soluções padrões através da diluição da solução estoque de MUF-padrão (1 mL de tampão, a 0,25 ml de solução-padrão). Para elevar o pH, serão adicionados 50 µL de NaOH (1M) em todas as amostras e no padrão. Em seguida, as soluções serão incubadas em microplacas por 20 minutos, a fluorescência será medida em um fluorímetro a 365 nm extinção, 450 nm de emissão (TECAN i-control 200Pro, Groedig, Áustria). A atividade de fosfatase será expressa em µmol g<sup>-1</sup> de massa seca h<sup>-1</sup>.

Para determinar o percentual de colonização por micorrizas arbusculares segmentos de raízes frescas serão retirados aleatoriamente das amostras <1 mm de diâmetro (como descrito acima), estocados em etanol 50% e mantidos a temperatura ambiente (26°C) até o início do processo de pigmentação das micorrizas arbusculares. As subamostras de raízes serão descoloridas em solução de KOH a 2,5% (Brundrett et al. 1984, 1996) e autoclavados a 120° C por aproximadamente 10 minutos. Se, mesmo após o procedimento de clareamento em autoclave (no máximo 30 minutos) as raízes não forem clareadas, as mesmas serão transferidas para solução alcalina de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mais 30 minutos para acelerar o processo de despigmentação. Depois de descoloridas, as raízes serão acidificadas em solução de HCl 2% durante 30 minutos, para então serem pigmentadas em azul de tripano 0,05% por 30 minutos. Para a avaliação da colonização de fungos micorrízicos arbusculares, as raízes serão cortadas em 20 fragmentos de um centímetro e fixadas paralelamente em lâminas de microscopia, utilizando álcool polivinílico (PVA). A leitura dessas lâminas será realizada em microscópio óptico, com objetiva de 40x, em intervalos de 0,3 milímetros ao longo da raiz, de forma a não sobrepor ou deixar alguma área da raiz sem leitura ao longo de um centímetro. Em cada área de leitura, serão contabilizadas estruturas micorrízicas de acordo com as seguintes categorias: I) sem estrutura micorrízica ou somente células radiculares; II) somente hifas; III) Hifas + arbúsculos; IV) hifas + vesículas e V) hifas + arbúsculos + vesículas. Dessa forma a colonização micorrízica será calculada em percentagem do comprimento da raiz colonizada por fungos micorrízicos arbusculares.

### **Objetivo específico 2**

Será instalado um experimento de decomposição de serapilheira, composta apenas por folhas dentro das câmaras de topo abeto (CTA), de forma a avaliar as alterações nos processos responsáveis pela liberação dos nutrientes em condições de CO<sub>2</sub> elevado. Em cada CTA serão alocadas cinco bolsas decompositoras (15 x 25 cm) com malha de 2mm, totalizando 60 bolsas decompositoras. O processo de decomposição será monitorado ao longo de um ano. As coletas serão realizadas no primeiro mês e a cada três meses, totalizando 6 coletas.

Após cada coleta, inicialmente, serão removidas todas as raízes finas encontradas nas bolsas decompositoras e realizados os procedimentos já citados no objetivo 1. Assim, conseguiremos monitorar possíveis alterações na dinâmica das raízes finas, ao longo do processo de decomposição e não somente em intervalos de 3 meses. Em seguida, com o material (folhas) ainda fresco, será determinada a atividade microbiana através da imobilização de C, N e P na biomassa dos microrganismos, além da potencial atividade das enzimas

extracelulares liberadas pelos microrganismos (metodologia descrita no objetivo 3). Logo após, todas as amostras serão secas em estufa de circulação de ar à 65° C por 72 horas.

O percentual de massa remanescente (MR %) que representa a taxa de decomposição da serapilheira, será obtido pela relação entre o peso inicial ( $P_0$ ) e o peso seco de cada coleta ( $P_f$ ), de acordo com a equação 1:

$$MR(\%) = \frac{P_0}{P_f} \times 100$$

Os valores da constante de decomposição da serapilheira ( $k$ ) serão obtidos a partir dos valores de massas remanescentes verificados ao longo de todo o período de incubação para cada fração, ajustados ao modelo exponencial proposto por Thomas and Asakawa (1993), conforme equação 2:

$$P_t = P_0 \times e^{-kt}$$

Onde,  $P_t$  descreve o peso seco remanescente da amostra após tempo ( $t$ ) em dias;  $P_0$  refere-se ao peso seco inicial de cada amostra no tempo zero ( $t=0$ ); O  $k$  descreve a constante de decomposição.

Após secas, as amostras serão moídas em moinho de facas para realização das análises nutricionais (metodologia descrita no objetivo 3) e posterior determinação da dinâmica nutricional. Os nutrientes remanescentes na serapilheira ao longo do processo de decomposição serão calculados de acordo com a expressão proposta por McGroddy *et al.* (2004), pela equação 3:

$$NR. FR = \frac{X_t * W_t}{X_0 * W_0} * 100$$

onde, NR são os nutrientes remanescentes, FR são as frações remanescentes,  $X_0$  é a concentração inicial média dos nutrientes ou compostos estruturais da serapilheira ( $n=4$ ),  $X_t$  é a concentração de nutrientes em um determinado tempo de coleta ( $t$ ),  $W_0$  é o peso seco inicial da serapilheira e  $W_t$  é o peso seco em determinado tempo de coleta ( $t$ ).

### **Objetivo específico 3**

A dinâmica de nutrientes em diferentes profundidades do solo será determinada a partir de coletas de estoque em intervalos de 3 meses. Utilizando um trado de copo com o diâmetro de 5 cm, em cada coleta será retirado o estoque de solo em dois pontos distintos (por CTA) e em cada ponto, em duas diferentes profundidades (0-5 cm e 5-15 cm). Os processos

microbianos, como imobilização de C, N e P na biomassa dos microrganismos, potencial atividade enzimática extracelular e concentração dos nutrientes serão monitorados ao longo de um ano.

As análises da potencial atividade enzimática extracelular e a preparação dos extratos para determinar a biomassa microbiana, tem que ser realizados com o material ainda fresco (no máximo 72 horas após a coleta). Assim, após cada coleta as amostras de solo e serapilheira (objetivo 2) são encaminhadas imediatamente ao laboratório de ciclos biogeoquímicos para dar início aos procedimentos necessários. A biomassa microbiana será determinada pelo método de fumigação por clorofórmio (Vance and Nadkarni 1990). Para a serapilheira, será utilizado 1 g de folhas de cada amostra para o processo de fumigação com clorofórmio por 24 horas, já para as amostras de solo serão utilizadas 4 g de cada amostra. Após o período de fumigação, as amostras referentes a cada compartimento (serapilheira e solo) serão divididas em duas alíquotas (serapilheira 0,5 g; solo 2 g), para a primeira alíquota de ambos os compartimentos será adicionado 20 ml de KCl 1M, onde será extraído C orgânico extraível e N total extraível. Na segunda alíquota, será adicionado 20 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M pH 8,5 para a extração do P orgânico e inorgânico extraível. Paralelamente, outro conjunto de amostras de cada compartimento (serapilheira e solo) serão preparadas para a extração direta com os mesmos extratores, sem passar pelo processo de fumigação. O conteúdo de C e N microbiano será estimado a partir da diferença de C orgânico e N orgânico solúvel fumigado e não fumigado medido por um analisador TOC/TN analyzer (TOC-V CPH E200V/TNM-1 220V; Shimadzu, Vienna, Austria), para o P total microbiano também será utilizada a diferença entre as amostras fumigadas e não fumigadas. O P total nos extratos será medido em um espectrofotômetro UV (Modelo 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão).

Os ensaios enzimáticos serão realizados para quatro enzimas hidrolíticas: Exoglucanase (CB), utilizando o substrato 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-cellobioside;  $\beta$ -Glucosidase (BG), a partir do substrato 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; Exochitinase (NAG), a partir do substrato 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide; e mono fosfatase ácida (PHOS), utilizando o substrato 4-methylumbelliferyl-phosphate. Os protocolos serão adaptados a partir de Marx et al. 2001, Saiya-Cork et al. 2002 e DeForest 2009. A extração das enzimas utilizará 0,5 g de folhas (objetivo 2) e solos de cada amostra contendo 50 ml de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. Em seguida, para analisar a atividade enzimática para cada substrato, serão pipetados 200  $\mu$ L da solução de enzimas extraídas para cada 50  $\mu$ L dos substratos específicos (3 repetições técnicas por amostra e enzima) em placas de microtitulação pretas.



Adicionalmente, 200  $\mu\text{L}$  de tampão serão pipetados em triplicadas que servirão como referência e de controle negativo. Para a curva padrão, é necessário preparar diferentes matrizes padrão methyl-umbelliferyl (MUF), pois o sinal de diferentes enzimas mostra diferentes intensidades. De acordo com a intensidade de respostas das enzimas, será pipetado 50  $\mu\text{L}$  da concentração adequada da solução padrão (MUF) e 200  $\mu\text{L}$  de buffer. As microplacas serão incubadas durante 40 minutos e a fluorescência será medida a uma excitação a 365 nm e 450 nm de emissão. A potencial atividade enzimática será expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1} (\text{seco}) \text{ h}^{-1}$  segundo (German et al. 2011). A fluorescência será medida em um analisador de microplacas (TECAN i-control 200Pro, Groedig, Austria).

Após a realização das análises com o material fresco, ambas amostras serão secas em estufa de circulação de ar para posteriores análises químicas. A concentração de carbono e nitrogênio serão analisadas em um analisador automático de C e N (Vario Max CN, Elementar, Alemanha), conforme método descrito por Pella (1990). Para determinação do fósforo, potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) será utilizado o protocolo de digestão nitro-perclórica descrito por Malavolta et al., (1989). Após a digestão, o P será determinado colorimetricamente (Olsen e Sommers, 1982; Murphy e Riley, 1962) usando um espectrofotômetro UV (Modelo 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão). As bases (K), (Ca) e (Mg) serão determinados por espectrofotometria de absorção atômica (AAS, 1100 B, Perkin-Elmer, Ueberlingen, Germany), conforme descrito por Anderson e Ingram (1993). A composição estrutural da serapilheira (objetivo 2), nomeadamente seus teores de lignina e celulose, serão determinados a partir do método proposto por Van Soest (1963).

### **Atividades previstas**

O projeto será realizado no período de quinze meses, ao longo desse período será realizado as seguintes atividades para permitir alcançar os objetivos mencionados. Instalação dos experimentos listados acima, ambos os experimentos vão ser monitorados ao longo de doze meses, especificamente para o objetivo 1 e 3 as coletas serão realizadas em intervalos de três meses. Para o objetivo 2, a primeira coleta será realizada trinta dias após a instalação do experimento em seguida será realizada também em intervalos de três meses até completar doze meses de monitoramento. Logo após a realização de cada coleta todos os materiais serão encaminhados para o laboratório de ciclos biogeoquímicos, para realização das análises que necessitam do material fresco. Após a finalização dos experimentos, os três próximos meses serão dedicados para análises químicas, físicas de todo o material acumulado.

### Detalhamento da estrutura física e tecnológica a ser utilizada

O experimento será implementado na Amazônia Central, mais precisamente na Estação Experimental de Silvicultura Tropical Núcleo ZF-2, localizada a, aproximadamente, 70 km ao norte da Manaus. O local é administrado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e tem uma longa tradição de pesquisa em ecologia de florestas tropicais, manejo florestal e interações biosfera-atmosfera. Para simular o aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera e avaliar como esse efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> influencia a dinâmica de nutrientes serão utilizadas câmaras de topo aberto (CTA). As CTAs foram instaladas sob supervisão e coordenação do programa AmazonFACE (Lapola e Norby 2014). A estrutura consiste em casas de vegetação cilíndricas, feitas de aço inox e policarbonato, medindo 3 metros de diâmetro e 2,5 metros de altura e com o topo completamente aberto. Pequenos tanques com CO<sub>2</sub> pressurizado, conectados a um sistema de ventiladores distribuem o ar enriquecido com CO<sub>2</sub> dentro da câmara. Como já citado anteriormente ao todo, serão oito CTAs. Quatro serão câmaras tratamento (eCO<sub>2</sub>), com um aumento de 200 ppm de em relação a concentração de CO<sub>2</sub> das câmaras controle (quatro com a concentração de CO<sub>2</sub> igual à do ambiente).

As análises de laboratório referente a ambos os objetivos específicos citados anteriormente serão realizadas no laboratório de ciclos biogeoquímicos e laboratório temático de solos e plantas, localizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Grande parte dos equipamentos que serão necessários já fazem parte do acervo tecnológico dos laboratórios citados. De todos os equipamentos listados nas metodologias descritas acima será incluindo no orçamento para aquisição, o microscópio óptico que será utilizado para determinação da taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares, visando assim responder o objetivo específico 1 e um forno mufla de 16 litros que será utilizado para analisar o conteúdo de lignina e celulose na serapilheira em processo de decomposição (objetivo específico 2). Os demais equipamentos serão utilizados em parceria com os laboratórios citados acima.

### Linhas gerais do cronograma a ser cumprido

	2020												2021		
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M
Atividades de campo – objetivo específico 1	X			X			X			X			X		
Atividades de laboratório – objetivo específico 1	X	X		X			X			X			X	X	X
Atividades de campo – objetivo específico 2	X	X			X			X			X			X	

Atividades de laboratório – objetivo específico 2		X			X			X			X			X	X
Atividades de campo – objetivo específico 3	X			X			X			X				X	
Atividades de laboratório – objetivo específico 3	X	X		X			X			X				X	X

### Planilha de orçamento com estimativa dos gastos previstos

<b>Categoria de despesa</b>	<b>Valor total (R\$)</b>
Uso e consumo	11,300.00
Serviços de terceiros – Pessoa física	4,800.00
Serviços de terceiros – Pessoa jurídica	00.00
Viagens	4,480.00
Equipamentos	16,599.00
Outros	00.00
<b>TOTAL</b>	<b>37,179.00</b>

### Resultados esperados e impacto previsto do projeto

Nós partimos do pressuposto de que a eficiência do efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> deve ser simultaneamente acompanhada com uma maior disponibilidade de nutrientes. Em áreas com baixa disponibilidade P, como é o caso da área de estudo, há uma espessa camada de raízes finas na serapilheira. Esse tapete de raízes é um importante mecanismo que possibilita aumentar a eficiência na aquisição de nutrientes, interceptando esses elementos recém mineralizados através da decomposição da serapilheira antes que eles sejam perdidos para a solução do solo. Em um cenário de fertilização por CO<sub>2</sub>, o C extra assimilado via fotossíntese poderá ser alocado para a produção de raízes finas, principalmente na serapilheira e camada superiores do solo. Aumentando assim a eficiência na interceptação de nutrientes. Além disso, essa maior biomassa de raízes finas pode estimular a decomposição da serapilheira influenciando diretamente a dinâmica de nutrientes no solo.

A constatação da limitação nutricional da floresta Amazônica e uma potencial exacerbação dessa limitação com o aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico poderá, portanto, afetar a produtividade das florestas. Isso implicaria no fato de que essas florestas provavelmente estarão mais vulneráveis às mudanças climáticas do que o atualmente previsto pelos modelos de projeção de sistema terrestre e ao invés de atuar como sumidouro de C, essas florestas podem desempenhar um papel de fonte de mais emissões de C para a atmosfera, reduzindo a capacidade da floresta de se adaptar e responder a eventos climáticos extremos e distúrbios como as secas. Confirmando se uma forte limitação nutricional, espera se que a Amazônia

central e os serviços ecossistêmicos que ela produz sejam muito vulneráveis à degradação como resultado das mudanças climáticas do século XXI.

Nesse sentido, o experimento descrito nessa proposta irá fornecer uma expressiva quantidade de dados inéditos sobre o comportamento dos principais processos e mecanismos responsáveis por intermediar a aquisição de nutrientes na floresta Amazônica submetida ao aumento de CO<sub>2</sub>. Reduzindo assim, incertezas quanto a magnitude do efeito de fertilização por CO<sub>2</sub> em florestas tropicais, e contribuindo para uma maior representatividade dos processos relacionados a ciclagem de nutrientes em simulações dos modelos de vegetação. Desta forma, os resultados desta pesquisa têm alto potencial para influenciar a formação de políticas públicas na área de conservação, dando fundamentos para a conservação da floresta do futuro. Além disso, como o assunto tratado neste projeto envolve uma das maiores incertezas sobre o futuro das florestas tropicais, acreditamos obter uma grande visibilidade e publicações de alto fator de impacto.

## Referências bibliográficas

- Anderson, J.M.; Ingram, J.S.I. 1993. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. CAB International, Wallingford, Oxford, UK.
- Ainsworth, E.A.; Rogers, A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: Mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* 30: 258–270.
- Cernusak, L.A.; Winter, K.; Dalling, J.W.; Holtum, J.A.M.; Jaramillo, C.; Körner, C.; et al. 2013. Tropical forest responses to increasing atmospheric CO<sub>2</sub>: Current knowledge and opportunities for future research. *Functional Plant Biology* 40: 531–551.
- DeForest, J.L. 2009. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-DOPA. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1180–1186.
- Feldpausch, T.R.; Lloyd, J.; Lewis, S.L.; Brienen, R.J.W.; Gloor, M.; Mendoza, A.M. 2012. Tree height integrated into pantropical forest biomass estimates. : 3381–3403.
- Finzi, A.C.; Allen, A.S.; DeLucia, E.H.; Ellsworth, D.S.; Schlesinger, W.H. 2001. Forest litter production, chemistry, and decomposition following two years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Ecology* 82: 470–484.
- German, D.P.; Weintraub, M.N.; Grandy, A.S.; Lauber, C.L.; Rinkes, Z.L.; Allison, S.D. 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1387–1397.
- Hirota, M. 2011. Global Resilience of Tropical Forest. 232.
- Hofhansl, F.; Andersen, K.M.; Fleischer, K.; Fuchslueger, L.; Rammig, A.; Schaap, K.J.; et al. 2016. Amazon Forest Ecosystem Responses to Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> and Alterations in Nutrient Availability: Filling the Gaps with Model-Experiment Integration. *Frontiers in Earth Science* 4: 1–9.
- IPCC. 2014. *Summary for Policymakers*. 2–26p.
- Iversen, C.M.; Ledford, J.; Norby, R.J. 2008. CO<sub>2</sub> enrichment increases carbon and nitrogen input from fine roots in a deciduous forest. *New Phytologist* 179: 837–847.
- Kuzyakov, Y. 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1363–1371.
- Kuzyakov, Y.; Friedel, J.K.; Stahr, K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1485–1498.

- Leadley, P.W.; Drake, B.G. 1993. Open top chambers for exposing plant canopies to elevated CO<sub>2</sub> concentration and for measuring net gas exchange. *Vegetatio* 104–105: 3–15.
- Lloyd, J.; Bird, M.I.; Veenendaal, E.M.; Kruijt, B. 2007. Should Phosphorus Availability Be Constraining Moist Tropical Forest Responses to Increasing CO<sub>2</sub> Concentrations? *Global Biogeochemical Cycles in the Climate System*: 95–114.
- Lugli, L.F.; Andersen, K.M.; Aragão, L.E.O.C.; Cordeiro, A.L.; Cunha, H.F.V.; Fuchslueger, L.; et al. 2019. Multiple phosphorus acquisition strategies adopted by fine roots in low-fertility soils in Central Amazonia. *Plant and Soil*.
- Malhi, Y.; Aragao, L.E.O.C.; Galbraith, D.; Huntingford, C.; Fisher, R.; Zelazowski, P.; et al. 2009. Exploring the likelihood and mechanism of a climate-change-induced dieback of the Amazon rainforest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 20610–20615.
- Marx, M.C.; Wood, M.; Jarvis, S.C. 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1633–1640.
- McGroddy, M.E.; Silver, W.L.; De Oliveira, R.C. 2004. The effect of phosphorus availability on decomposition dynamics in a seasonal lowland amazonian forest. *Ecosystems* 7: 172–179.
- Norby, R.J.; Ledford, J.; Reilly, C.D.; Miller, N.E.; O'Neill, E.G. 2004. Fine-root production dominates response of a deciduous forest to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9689–9693.
- Norby, R.J.; Warren, J.M.; Iversen, C.M.; Medlyn, B.E.; McMurtrie, R.E. 2010. CO<sub>2</sub> enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 19368–19373.
- Norby, R.J.; DeLucia, E.H.; Gielen, B.; Calfapietra, C.; Giardina, C.P.; King, J.S.; et al. 2005. Forest response to elevated CO<sub>2</sub> is conserved across a broad range of productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 18052–18056.
- Phillips, R.P.; Meier, I.C.; Bernhardt, E.S.; Grandy, S.; Wickings, K.; Finzi, A.C.; et al. 2012. Roots and fungi accelerate carbon and nitrogen cycling in forests exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Ecology letters* 15: 1042–1049.
- Quesada, C.A.; Lloyd, J.; Schwarz, M.; Patiño, S.; Baker, T.R.; Czimczik, C.; et al. 2010. Variations in chemical and physical properties of Amazon forest soils in relation to their genesis. *Biogeosciences* 7: 1515–1541.

- Saiya-Cork, K.; Sinsabaugh, R.; Zak, D.. 2002. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1309–1315.
- Vance, E.D.; Nadkarni, N.M. 1990. Microbial biomass and activity in canopy organic matter and the forest floor of a tropical cloud forest. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 677–684.