

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA- CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Influência das Formigas Edáficas em Propriedades
do Solo, Fixação Biológica de Nitrogênio e Fitólitos,
em Áreas Cultivadas no Sistema Integrado de
Produção Agroecológica**

Carlos Alberto Ribeiro de Moura

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-
CIÊNCIAS DO SOLO**

**INFLUÊNCIA DAS FORMIGAS EDÁFICAS EM PROPRIEDADES DO
SOLO, FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E FITÓLITOS EM
ÁREAS CULTIVADAS NO SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO
AGROECOLÓGICA**

CARLOS ALBERTO RIBEIRO DE MOURA

Sob a orientação da Professora
Maria Elizabeth Fernandes Correia

e Co-orientação do Professor
Jerri Édson Zilli

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Ciência do Solo, Área de
Concentração em Fertilidade do Solo e
Nutrição de Plantas.

Seropédica, RJ
Setembro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M929i	<p>Moura, Carlos Alberto Ribeiro de, 1976- Influência das Formigas Edáficas em Propriedades do Solo, Fixação Biológica de Nitrogênio e Fitólitos, em Áreas Cultivadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica/Carlos Alberto Ribeiro de Moura. – Seropédica, 2020. 98 f.: il.</p> <p>Orientadora: Maria Elizabeth Fernandes Correia. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2023.</p> <p>1. Silício. 2. Análise de redução de acetileno. 3. Metagenômica. I. Correia, Maria Elizabeth Fernandes, 1967-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.</p>
-------	---

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 5 / 2020 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.048517/2020-64

Seropédica-RJ, 25 de setembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

CARLOS ALBERTO RIBEIRO DE MOURA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Organismos do solo e interação com plantas.

TESE APROVADA EM 25/09/2020.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 25/09/2020 18:43)

FABIO SOUTO DE ALMEIDA
DeptCMA (12.28.01.00.00.00.18)
Matrícula: 1767348

(Assinado digitalmente em 25/09/2020 18:09)

LUCIA HELENA CUNHA DOS ANJOS
PROAPP (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 387335

(Assinado digitalmente em 25/09/2020 17:23)

FABRICIO BEGGIATO BACCARO
CPF: 017.469.639-64

(Assinado digitalmente em 02/10/2020 09:28)

MARIELLA CAMARDELLI UZEDA
CPF: 465.566.305-78

(Assinado digitalmente em 25/09/2020 17:25)

EDERSON DA CONCEICAO JESUS
CPF: 084.646.497-70

(Assinado digitalmente em 28/09/2020 08:16)

MARIA ELIZABETH FERNANDES CORREIA
CPF: 932.320.637-72

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **5**, ano: **2020**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **25/09/2020** e o código de verificação: **0950edb369**

“Absence of evidence is not evidence of absence.”

Carl Sagan

“We should preserve every scrap of biodiversity as priceless while we learn to use it and come to understand what it means to humanity.”

E. O. Wilson

“If you really want to study evolution, you've got go outside sometime, because you'll see symbiosis everywhere!”

Lynn Margulis

DEDICATÓRIA

A minha cúmplice, namorada e esposa e aos seus pequenos comparsas...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus antepassados espirituais.

Agradeço profundamente aos meus antepassados científicos.

Minha eterna gratidão a minha família que embarcou comigo nessa jornada de maneira incondicional.

A Dr. Elizabeth Correia e ao Dr. Jerri Zilli pela amizade, orientação e paciência.

Ao Dr. Ederson de Jesus que me incentivou a seguir com a idéia do sequenciamento genético do microbioma e viabilizou um pequeno sonho. Ao meu colega e escudeiro Thiago Farlon que foi vital para a implementação do protocolo final de extração de DNA das formigas e alinhamento das sequências.

A Dr^a Andreia Loviane por receber a mim e a centenas de formigas no laboratório com tanta atenção e presteza e por viabilizar as análises de redução de acetileno e os cafezinhos na NespressoTM.

A Dr^a Irene da Silva Coelho que concretizou o envio das amostras para o sequenciamento, parte importante deste estudo.

Ao Professor Everado Zonta pelo afinho na manutenção do curso.

Ao Professor Marcos Gervasio e sua equipe incansável pelo apoio nas análises.

Aos professores do PPGA-CS em especial a Dr^a. Elizabeth Correia e a Dr^a. Lúcia Anjos por ministrarem aulas dignas de deixar saudades em um aluno de pós-graduação.

Aos colegas de curso. Em especial ao inoxidável Eduardo Neto que conduziu as análises de fitólitos.

As formigas edáficas neotropicais e ao Dr. Jorge Luís Pereira de Souza mirmecólogo e personal deskhelp do R.

A toda a equipe da Secretaria do PPGA-CS.

Ao Roberto Silva companheiro de coletas e doloridas picadas e mago do café com canela, ao colega Fernando e ao Seu Paulo Genaro por me receberem e me ajudarem no Laboratório de Fauna do Solo na Embrapa Agrobiologia. A equipe do Laboratório de Controle Biológico pela parceria em especial ao colega Adamastor Barros por me receber em seu experimento.

Aos membros da banca pelas contribuições apresentadas para a melhoria desta tese.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ por manterem o curso. A UFRRJ e a Embrapa Agrobiologia pela oportunidade. Ao INCRA pela liberação para cursar o doutorado.

O material biológico coletado para este estudo foi cadastrado no SISGEN com o registro AC29053.

BIOGRAFIA

Carlos Alberto Ribeiro de Moura, filho de Carlos Alberto de Moura e Maria Isabel Ribeiro de Moura nasceu em 5 de julho de 1976 na cidade de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro. Em 2002 graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante sua graduação teve a oportunidade de iniciar sua jornada científica com Fauna do Solo no laboratório do Professor Ricardo Berbara. Após a conclusão da graduação cursou o Mestrado em Ecologia no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, tendo estudado formigas de liteira e métodos estatísticos de rarefação de amostras sob orientação da Dr^a Elizabeth Franklin. Em seguida começou carreira de Perito Federal Agrário no Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária e em 2007 adentrou concomitantemente na promissora carreira de pai. Após dez anos trabalhando como Perito em Roraima e no Espírito Santo, e três anos após se tornar pai de gêmeos, retornou a sua *alma mater* para continuar o treinamento desta vez em Ciência do Solo tendo novamente como orientadora uma Dr^a por nome de Elizabeth. Oscilando entre os personagens de pai, marido, ciclista, *quarentener* e cientista louco concluiu o doutorado onde estudou com muita satisfação a ação dos Hymenoptera eussociais mais interessantes dos últimos 135 milhões de anos nos ecossistemas mais desconhecidos do mundo: as formigas dos solos tropicais cultivados.

RESUMO GERAL

MOURA, Carlos Alberto Ribeiro de. **Influência das Formigas Edáficas em Propriedades do Solo, Fixação Biológica de Nitrogênio e Fitólitos, em Áreas Cultivadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica**. 2020. 98f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Este estudo abordou os efeitos decorrentes da ação de *Solenopsis invicta* Buren sobre a bioturbação e estoques de nutrientes em solos sob manejo agroecológico, ocorrência de fixação biológica e atração da assembleia de formigas por cultivos de plantas atrativas. As formigas edáficas são um grupo importante de bioturbadores e são amplamente encontradas em agroecossistemas. *S. invicta* é classificada funcionalmente como predadora generalista, sendo hábil em explorar ambientes perturbados. No Capítulo I foi testada a hipótese de que *S. invicta* ao construir seus ninhos e agir como vetor biológico de nutrientes, altera os teores de nutrientes e parâmetros de fertilidade do solo (C, N, P, K, Ca, Mg, Si, H+Al, V%), assim como as frações granulométricas e a assembleia de fitólitos (Poaceae, Eudicotyledonae, Arecaceae, Cyperaceae). No Capítulo II foi testada a hipótese de que *S. invicta* estabelece associação com bactérias fixadoras de nitrogênio. E no Capítulo III foi verificada a capacidade de se empregar plantas atrativas (PAs) na atração da mirmecofauna. Nos ninhos de *S. invicta* se observou aumento nos teores de C, P, K e V% e uma redução na acidez total, assim como redução no teor de argila total e aumento no teor de areia grossa. A assembleia de fitólitos sofreu alterações em três dos quatro grupos analisados e os teores de silício PASi (Si disponível para plantas), ASi (sílica amorfa) e AIF (fração insolúvel em ácido) apresentaram forte aumento em relação ao solo testemunha sendo que ASi apresentou diferença média de 243,23 g.kg⁻¹ de solo. Todas as amostras submetidas à análise de redução de acetileno apresentaram produção de etileno e a fixação média foi de 4,3 nmol de N fixado.g (peso úmido). h⁻¹ (n=44). As bactérias associadas a *S. invicta* foram identificadas através de metagenômica. Os dados de atividade no experimento de PAs submetidos à análise multivariada de PERMANOVA não detectou diferença entre tratamentos, mas detectou entre coletas que se traduz como efeito do tempo decorrente desde a última aração. A recomendação para atração de formigas seria a de se manter a cobertura vegetal ainda que espontânea e que estes refúgios não sejam submetidos ao revolvimento do solo, promovendo assim a diversidade da mirmecofauna e os serviços que ela pode prover. Estes dados podem ter impacto nos estudos de carbono no solo, em especial sua componente inorgânica, no entendimento da dinâmica do silício e servir de base para estudos com bactérias solubilizadoras ao apontar os ninhos como possíveis centros de atividade destas bactérias. Supõe-se que a FBN em *S. invicta* seja um holofenótipo importante para o sucesso da espécie como holobionte invasor e hábil em explorar áreas perturbadas. Este é o primeiro estudo indicando a ocorrência de FBN em operárias de formigas e revela uma fonte não quantificada nos agroecossistemas.

Palavras-chave: Silício. Análise de redução de acetileno. Metagenômica.

GENERAL ABSTRACT

MOURA, Carlos Alberto Ribeiro de. **Influence of edaphic ant fauna on soil properties, biological nitrogen fixation and phytoliths, in cultivated areas in the Sistema Integrado de Produção Agroecológica**. 2019. 98p. Thesis (Doctor in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

This study addressed the effects of the *Solenopsis invicta* Buren (SI) on bioturbation and nutrient stocks in soils under agroecological management, the occurrence of biological nitrogen fixation in SI and the attraction of ant assembly to attractive plant crops. Edaphic ants are an important group of bioturbators, and SI are widely found in agroecosystems. SI can be classified as generalist predators and are efficient at exploring disturbed environments. In Chapter I, the hypothesis that SI when building their nests and acting as biological vectors of nutrients alters nutrient levels and soil fertility parameters as C, N, P, K, Ca, Mg, Si, H + Al, V%, the granulometric fractions and the phytoliths assembly (Poaceae, Eudicotyledonae, Arecaceae, Cyperaceae) was verified. In Chapter II, the hypothesis that this SI in association with nitrogen-fixing bacteria would be able to perform biological nitrogen fixation was assessed. And in Chapter III, the ability to use attractive plants (PAs) to attract the myrmecofauna was tested. There was an increase in the concentration of C, P, K, in V% and coarse sand and a reduction in total acidity and in total clay in the nests. The phytolith assembly changed in three of the four groups analyzed and the silicon content PASi (Si available for plants), ASi (amorphous silica) and AIF (acid insoluble fraction) showed a strong increase in relation to the control soil, with ASi presenting mean difference of 243.23 g.kg of soil. All samples submitted to acetylene reduction analysis showed ethylene production and the average fixation was 4.3 nmol of fixed N. g (wet weight). h⁻¹ (n = 44). The bacteria associated with SI were identified through metagenomics. The activity data obtained in the PAS experiment submitted to multivariate analysis of PERMANOVA did not detect any difference between treatments but detected between sampling events which translates as an effect of the time that has elapsed since the last plowing. These silicon data can have an impact on soil carbon studies, especially its inorganic component, on the understanding of silicon dynamics and serve as a basis for studies with solubilizing bacteria by pointing out nests as possible centers of activity for these bacteria. It is assumed that FBN in SI is an important holophenotype for the success of SI as an invading holobiont and skilled in exploring disturbed areas. This is the first study indicating the occurrence of FBN in ant workers and reveals a source not yet quantified in agroecosystems and natural ecosystems. As there was no effect of the treatments, it is recommended that a vegetation cover is maintained, even if spontaneous, and that these refuges are not submitted to plowing, thus maintaining the diversity of the myrmecofauna and the services that it can provide.

Keywords: Silicon. Acetylene reduction assay. Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Croqui da área de amostragem dos ninhos de formigas, inserida na área da SIPA. Imagem: Google Earth, croqui gerado no QGIS.	12
Figura 2. Margem de área cultivada em pousio com um típico ninho de <i>Solenopsis invicta</i> Buren em primeiro plano contendo uma marcação que foi instalada durante o mapeamento dos ninhos.	13
Figura 3. Solo superficial dos ninhos ainda com as operárias e imaturos. As amostras foram mantidas abertas na casa de vegetação possibilitando o escape dos animais.	14
Figura 4. Amostra de solo do ninho após a saída dos animais sendo exposta para secagem ao ar visando obter a alíquota para as análises químicas de solo e de fitólitos.	14
Figura 5. Conjunto de amostras de solo do ninho e solo testemunha sendo expostas para secagem ao ar visando obter a alíquota para as análises químicas de solo e de fitólitos... ..	15
Figura 6. Operária de <i>Solenopsis invicta</i> Buren (ANTWEB, 2023).	16
Figura 7. Valores do peso do domo dos 30 ninhos utilizados para as análises químicas e fitólitos (peso médio = 2,67 kg).	17
Figura 8. Distribuição dos dados da fração granulométrica correspondente ao teor de Argila Total no domo dos ninhos e no material de solo testemunha ($p < 0,0002$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.	18
Figura 9. Distribuição dos dados da fração granulométrica correspondente a Areia grossa no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,00175$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.	18
Figura 10. Distribuição dos valores de Acidez Total (H+Al) em cmolc.dm ⁻³ no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p = 0,00014$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os outliers (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.	19
Figura 11. Distribuição dos dados de Potássio (K) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os outliers (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.	20
Figura 12. Distribuição dos dados de concentração de Fósforo (P) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p = 0,018$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os outliers (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.	21

- Figura 13.** Distribuição dos dados de Valor V% no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média. 21
- Figura 14.** Distribuição dos dados de Carbono Orgânico Total (COT) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os *outliers* (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média. 22
- Figura 15.** Composição percentual dos tipos de fitólitos no solo e nos ninhos tendo sido registrada diferença para Fitólitos de Poaceae e Eudicotyledoneae ($p < 0,0001$), o campo “outros” representa os fitólitos de Cyperaceae e Arecaceae. Se observou diferença para Fitólitos de Cyperaceae ($p = 0,0004$) não havendo diferença para fitótilos de Arecaceae ($p = 0,4569$). 23
- Figura 16.** Morfotipos de fitólitos (A) *Elongate psilate*; (B) *Elongate echinate*; (C) Acicular hair cell; (D) *Cuneiform bulliform*; (E) *Parallelepipedal bulliform*; (F) Rondel; (G) Trapeziform; (H) Bilobate; (I) Cross; (J) Polylobate; (K) Saddle; (L) Cone shape; (M) Block; (N) Globular psilate; (O) Globular rugose; (P) Globular echinate; (Q) Articulado globular echinate; (R) Articulado puzzle; (S) Articulado epidermic cells; (T) Articulado stomatic cells. As barras pretas correspondem a escala 10 μm . Fotos: Eduardo Neto. 24
- Figura 17.** Distribuição dos dados de Silício prontamente disponível para as plantas (PASi) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = 118,71 mg.kg^{-1}). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média. 25
- Figura 18.** Distribuição dos dados de Silício amorfo (ASi) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = 243,23 mg.kg^{-1}). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média. 26
- Figura 19.** Distribuição dos dados da Fração insolúvel em ácido (AIF) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = 0,0877 g.g^{-1} de solo). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média. 27
- Figura 20.** Bastão de PVC sendo usado para coletar as operárias após perturbação mecânica do ninho. 38
- Figura 21.** Recipiente de contenção da amostra logo após a coleta com as operárias utilizadas para as análises de redução de acetileno e metagenômica. A fuga das operárias é impedida pela ação do talco industrial aplicado na borda do recipiente. 39
- Figura 22.** Vials com as formigas após a exposição ao acetileno e os respectivos vials com a atmosfera retirada após a exposição ao acetileno. Imagem da primeira coleta com 30

amostras realizada em novembro de 2017. Em todas as amostras as formigas permaneceram vivas após o término da exposição ao acetileno.	40
Figura 23. Abundância relativa dos Gêneros por amostras de formigas da espécie <i>S. invicta</i> de 15 diferentes ninhos (n=15). Para fins de visualização apenas estão representados apenas gêneros com abundância maior que 7%. O filtro de abundância para as análises foi de 3%.....	44
Figura 24. Composição dos gêneros por amostras de formigas da espécie <i>Solenopsis invicta</i> de 15 diferentes ninhos sem exibir as frequências de <i>Wolbachia</i> (n=15). Para fins de visualização apenas estão representados apenas gêneros com abundância maior que 7%. O filtro de abundância para as análises foi de 3% Estão representadas apenas Gêneros com abundância maior que 5%.....	45
Figura 25. Gráficos dos resultados da ARA do primeiro conjunto de amostras de formigas da espécie <i>Solenopsis invicta</i> de 30 diferentes ninhos ARA (n=30). A: conjunto de dados em nmol de C ₂ H ₄ .g-1.h-1; B: conjunto de dados em nmol de N fixado.g-1(peso úmido).h-1 utilizando um fator de conversão de 3:1.....	48
Figura 26. Gráficos dos resultados da ARA do segundo conjunto de amostras de formigas da espécie <i>Solenopsis invicta</i> de 15 diferentes ninhos ARA (n=14). A: conjunto de dados em nmol de C ₂ H ₄ .g-1.h-1; B: conjunto de dados em nmol de N fixado.g-1.h-1 utilizando um fator de conversão de 3:1.....	49
Figura 27. Número de indivíduos de <i>Labidus</i> em por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	63
Figura 28. Número de indivíduos de <i>Wasmannia</i> por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	64
Figura 29. Número de indivíduos de <i>Pheidole</i> coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	64
Figura 30. Número de indivíduos de <i>Solenopsis</i> coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	65
Figura 31. Número de indivíduos de <i>Atta</i> coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	66
Figura 32. Número de indivíduos de <i>Dorymyrmex</i> coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de plantas por linha (4m) adotado no plantio do experimento.	60
Tabela 2. Resultado da PERMANOVA com dados das comunidades de formigas das cinco coletas.	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I BIOTURBAÇÃO E AS ALTERAÇÕES NO SOLO COM ÊNFASE NA FERTILIDADE E NA DINÂMICA DO SILÍCIO	4
2.1 RESUMO.....	5
2.3 ABSTRACT.....	6
2.4 INTRODUÇÃO	7
2.5 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.6 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.6.1 Área de estudo.....	12
2.6.2 Atributos físicos e químicos do solo	13
2.6.3 Extração e identificação de fitólitos.....	15
2.6.4 Identificação de formigas.....	16
2.6.5 Análises estatísticas.....	16
2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
2.8 CONCLUSÕES	29
3. CAPÍTULO II MICROBIOMA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM <i>SOLENOPSIS</i>	30
3.1 RESUMO.....	31
3.2 ABSTRACT.....	32
3.3 INTRODUÇÃO	33
3.4 REVISÃO DE LITERATURA.....	34
3.5 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.5.1 Área de coleta.....	38
3.5.2 Coleta e acondicionamento dos indivíduos e exposição ao acetileno.....	38
3.5.3 Análise de redução de acetileno.....	39
3.5.4 Microbioma de <i>Solenopsis invicta</i>	41
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.7 CONCLUSÕES	50
4. CAPÍTULO III PLANTAS ATRATIVAS E A COMUNIDADE DE FORMIGAS EDÁFICAS.....	51
4.1 RESUMO.....	52
4.2 ABSTRACT.....	53
4.3 INTRODUÇÃO	54
4.4 REVISÃO DE LITERATURA.....	55
4.5 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.5.1 Área de estudo.....	60
4.5.2 Plantas utilizadas e desenho experimental	60
4.5.3 Análise estatística.....	61
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5. CONCLUSÕES	68

6. CONCLUSÕES GERAIS	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento sobre os impactos do manejo agrícola de solos tropicais é de grande importância para estabelecer boas práticas visando o uso sustentável e sua recuperação onde necessário. As práticas agrícolas determinam o nível de produção de alimentos e em grande extensão o estado geral do ambiente global, sendo estimado que cerca da metade das terras agricultáveis já estão em uso (POORE; NEMECEK, 2018; TILMAN et al., 2002).

Numa tentativa de reunir seus países membro em torno de ações concretas rumo ao desenvolvimento sustentável foram estabelecidos em 2015 pelas Nações Unidas 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) constituindo assim uma agenda com metas a serem atingidas até 2030 e apesar destes ODS não citarem nominalmente o termo “solo” apresentam diversos objetivos que dependem em larga escala deste recurso finito (BOUMA; MONTANARELLA; EVANYLO, 2019). Dentre os objetivos o de número 15 prevê: “Proteger, restaurar e promover o uso sustentável de ecossistemas terrestres, manejo sustentável de florestas, combater a desertificação e suprimir e interromper a degradação dos solos e a perda de biodiversidade” e para que estes objetivos sejam concretizados faz-se necessário que a tomada de decisão seja baseada na ciência (LUBCHENCO et al., 2015).

Muitas são as evidências de que práticas agrícolas que buscam aumentar a intensidade do uso das áreas agrícolas, baseadas em simplificação dos agroecossistemas e uso sistemático de adubos químicos e agrotóxicos, têm gerado a redução na biodiversidade e da biomassa de diversos grupos de animais englobando mamíferos insetívoros, pássaros e a entomofauna (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019).

Por outro lado, em áreas de manejo agroecológico (*sensu* GLIESSMAN, 2013) espera-se que os serviços ecossistêmicos sejam mantidos e que o solo seja preservado de maneira ampla, incluindo sua parte viva (COCK et al., 2012). O aproveitamento de serviços ecossistêmicos de organismos de ocorrência natural é uma abordagem de baixo custo, porém subutilizada uma vez que os papéis funcionais dos organismos não são apresentados como estando diretamente ligados à produtividade das culturas, ou seja, não possuem um valor econômico diretamente associado a eles (BRIONES, 2014; EVANS et al., 2011; SANABRIA; LAVELLE; FONTE, 2014). Apesar de pouco utilizado este aproveitamento é altamente desejável em cultivos agroecológicos onde o uso de insumos deve ser feito com parcimônia evitando repetir os erros da agricultura intensiva e altamente dependente de insumos externos (ALTIERI, 1999).

Dentre os organismos do solo que participam e são importantes para o sucesso de muitos dos processos descritos e vitais para se atingir a sustentabilidade dos agroecossistemas temos as formigas. Formigas são artrópodes da Classe Insecta (insetos) membros da Ordem Hymenoptera com o corpo segmentado em cabeça, alitrônco, pecíolo (um ou dois dependendo do grupo), possuindo três pares de perna e antena geniculada, apresentando um par de glândulas exócrinas conhecidas como glândula metapleural e com hábitos eussociais que geralmente implica em operárias sem capacidade reprodutiva (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A família Formicidae que por sua vez abriga todas as formigas é um grupo de insetos eussociais hiper diverso, com ampla distribuição no planeta e biomassa estimada em cerca da metade da biomassa total dos demais artrópodes e são encontradas em registros fósseis com datas em torno de 135 milhões de anos (SMITH et al., 2011; TSCHINKEL, 2003; WARD, 2007; WILSON; TAYLOR, 1964). São reconhecidas como engenheiros do ecossistema e agentes importantes de bioturbação e como componentes dos agroecossistemas contribuem para seu funcionamento e sustentabilidade aumentando a porosidade dos solos, controlando insetos com potencial de se

tornarem pragas, atuando na polinização de plantas dentre outras funções (BENCKISER, 2010; MARICHAL et al., 2014; MARÍN; JACKSON; PERFECTO, 2015).

Podendo apresentar entre as espécies hábitos de nidificação e forrageamento que podem variar de endogêicos a arbóreos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; KING, 2016) a distribuição das formigas depende da disponibilidade de recursos alimentares, locais disponíveis para nidificação e ocorrência de perturbações e variações no microclima. No caso das formigas edáficas - grupo que compreende as formigas que nidificam no solo – estas dependem em especial de variações na umidade do solo, sendo que o uso de agrotóxicos e práticas de manejo com intenso revolvimento do solo, como a aração e subsolagem, tendem a influenciar significativamente na composição e atividade da mirmecofauna, geralmente resultando em diversidade menor de espécies em áreas cultivadas (KASPARI; WEISER, 2000; LEVINGS; FRANKS, 1982; LOBRY DE BRUYN, 1999).

Sabe-se que apenas o uso da prática da aração é capaz de reduzir a densidade de ninhos e o efeito do emprego combinado de aração e irrigação também afeta negativamente o número de aberturas dos ninhos que por sua vez são função da atividade da colônia (WANG et al., 1995). Exemplos como estes evidenciam que as formigas apresentam rápida resposta ao estresse ambiental e, por possuírem curto tempo de geração, serem facilmente coletáveis e relativamente fáceis de serem identificadas as tornam passíveis de uso como indicadores biológicos em agroecossistemas. Entretanto para se utilizar as formigas como indicadores de solos saudáveis há a necessidade de antes se entender e identificar quais espécies ou grupos de espécies tem papel chave na manutenção de ciclos de matéria e fluxos de energia no ecossistema. Comumente as formigas são estudadas em contexto de desserviços e não de serviços ecossistêmicos, nos quais são amplamente relevantes (GONTHIER et al., 2013; HOLEC; FROUZ, 2006; LOBO; TABARELLI; LEAL, 2011; WIELGOSS et al., 2013). Destaca-se também que apenas poucas espécies de formigas têm algo mais do que sua taxonomia definida, isto é, pouco se sabe sobre sua ecologia ou fisiologia limitando assim a compreensão a respeito de seus potenciais na provisão de serviços ecossistêmicos (DEL TORO; RIBBONS; PELINI, 2012).

Qualidade do solo é definida como a capacidade do solo de manter suas funções e sustentar a produtividade mantendo a qualidade ambiental e promovendo sanidade de animais e plantas e esta qualidade pode ser descrita através de atributos físicos, químicos e biológicos (CARTER et al., 1997). As formigas representam assim parte importante dos fatores bióticos que constituem a qualidade dos solos (BÜNEMANN et al., 2018). O estabelecimento de quais formigas são importantes em termos de qualidade do solo requer conhecimento e a quantificação dos impactos da mirmecofauna ao longo do perfil do solo e dentre diferentes tipos de solo (LOBRY DE BRUYN, 1999) uma vez que a qualidade do solo é específica para cada local (BÜNEMANN et al., 2018).

Esta tese traz como hipóteses principais que (i) as alterações biomecânicas promovidas no solo pelas comunidades de formigas edáficas influenciam a disponibilidade de nutrientes; (ii) que o microbioma de formigas edáficas, importante componente da fauna do solo aqui representado pela formiga de fogo (*Solenopsis invicta* Buren), pode ser uma via de entrada de nitrogênio via fixação biológica; e (iii) que a presença de determinados cultivos ou combinação de cultivos é capaz de atrair formigas para áreas agrícolas e, desta forma, promover o controle natural de insetos fitófagos.

O documento foi dividido em capítulos a saber: Capítulo I – Bioturbação e alteração nos solos – aborda as alterações no solo promovidas por *Solenopsis* apresentando dados sobre a movimentação de solo e mudanças nos teores de nutrientes com ênfase no silício através da

análise de fitólitos; Capítulo II – Microbioma e fixação biológica de nitrogênio em *Solenopsis* – são apresentados os referenciais teóricos que levaram a hipótese de que poderia se esperar a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio no interior das formigas, o teste desta hipótese e os dados sobre as quantidades observadas nos resultados dos testes de redução de acetileno e a identificação das bactérias provavelmente envolvidas no processo; Capítulo III – Plantas atrativas e a comunidade de formigas edáficas – é descrito experimento de manejo conservativo de pragas através do uso de plantas de cobertura do solo sendo apresentados os dados da comunidade de formigas edáficas. Espera-se assim ao longo destes três capítulos destacar aspectos positivos da ocorrência das formigas nos agroecossistemas e advogar a favor da manutenção dos serviços ecossistêmicos que estas podem fornecer.

2. CAPÍTULO I

BIOTURBAÇÃO E AS ALTERAÇÕES NO SOLO COM ÊNFASE NA FERTILIDADE E NA DINÂMICA DO SILÍCIO

2.1 RESUMO

As formigas edáficas são um grupo importante de bioturbadores e *Solenopsis invicta* Buren (SI) é uma espécie amplamente encontrada em agroecossistemas. *S. invicta* podem ser classificadas como predadoras generalistas e são hábeis em explorar ambientes perturbados. Foi testada a hipótese de que as *S. invicta* ao construírem seus ninhos e agirem como vetores biológicos de nutrientes alterem os teores de nutrientes e parâmetros de fertilidade (C, N, P, K, Ca, Mg, Si, H+Al, V%) e a assembleia de silicofitólitos (Poaceae, Eudicotyledonae, Arecaceae, Cyperaceae) em um agroecossistema cultivado no regime de agricultura orgânica. Foram coletadas amostras de solo de 30 ninhos com trinta amostras testemunha comparadas por testes pareados (Teste t e Wilcoxon). Se verificou um incremento de carbono orgânico total, fósforo, potássio e silício e uma redução na acidez total nos ninhos. As três frações de silício PAsi (Si disponível para plantas), ASi (sílica amorfa) e AIF (fração insolúvel em ácido) apresentaram forte aumento em relação ao solo testemunha sendo que ASi que inclui os fitólitos teve uma diferença média de 243,23 mg.kg⁻¹ de solo. Quanto às assembleias de fitólitos houve uma redução de Poaceae (- 20,56% em média) na participação percentual e aumento de Eudicotyledonae em 21,40% o que pode ter origem nos insetos fitófagos capturados como presas. Os fitólitos de Cyperaceae apresentaram uma redução nos ninhos de 0,36% e não se percebeu alteração na participação de fitólitos de Arecaceae. Argumenta-se que o acúmulo de material nos ninhos, a ação de intemperismo biologicamente acelerado por ação das formigas e de microrganismos associados com capacidade de solubilização de K, P e Si possam explicar este incremento. A reação do Si aportado com o Al seria por sua vez o motivo da redução da acidez total. Este estudo confirma o incremento de macronutrientes já encontrado em outros estudos e trata-se do primeiro estudo realizado apontando um incremento de Si e alteração na assembleia de fitólitos em ninho de formigas e consequentemente em ninhos de *Solenopsis invicta*. Esta descoberta pode ter impacto nos estudos de carbono no solo, em especial sua componente inorgânica, no entendimento da dinâmica do silício e servir de base para estudos com bactérias solubilizadoras ao apontar os ninhos como possíveis centros de atividade destas bactérias.

Palavras chave: Silício. Bioturbação. Macronutrientes.

2.3 ABSTRACT

Edaphic ants are an important group of bioturbators and *Solenopsis invicta* Buren is a species widely found in agroecosystems. *S. invicta* can be classified as generalist predators and are fond to explore disturbed environments. It was tested the hypothesis that *S. invicta* when building their nests and acting as biological vectors of nutrients alters the nutrient contents and fertility parameters (C, N, P, K, Ca, Mg, Si, H + Al, V%) and the assembly of silicon phytoliths (Poaceae, Eudicotyledoneae, Arecaceae, Cyperaceae) in an agroecosystem cultivated in the regime of organic agriculture. Soil was collected from 30 nests with thirty control samples compared by paired tests (t-test and Wilcoxon). There was an increase in total organic carbon, phosphorus, potassium and silicon and a reduction in total acidity in the nests when compared to the surrounding soil (0-10cm). The three fractions of silicon PAsi (plant available Si), ASi (amorphous silica) and AIF (acid insoluble fraction) showed a strong increase in relation to the control soil, whereas ASi that includes phytoliths had an average difference of 243.23 mg.kg⁻¹ from soil samples. As for phytolith assemblages, there was a percentage reduction in Poaceae (- 20.56%) and an increase in Eudicotyledoneae by 21.40%, which may originate from phytophagous insects captured as prey. Phytoliths of Cyperaceae showed a reduction in the nests of 0.36% and no change in the participation of phytoliths of Arecaceae was noticed. It is argued that the accumulation of material in the nests, the action of biologically enhanced weathering by the action of ants and microorganisms associated with the ability to solubilize K, P and Si may explain this increase. The reaction of Si with Al would in turn be the reason for the reduction in total acidity due to formation of aluminosilicates. This study confirms the increase in macronutrients already found in other studies and it is the first study carried out pointing out an increase in Si and alteration in the assembly of phytoliths in ants' nest and consequently in nests of *Solenopsis invicta*. This discovery may have an impact on soil carbon studies, especially its inorganic component, on the understanding of silicon dynamics and can serve as a basis for studies with solubilizing bacteria by pointing out nests as possible hotspots for these bacteria.

Keywords: Silicon. Bioturbation. Macronutrients.

2.4 INTRODUÇÃO

O solo não pode ser fácil e prontamente definido por quem reflete sobre seus mistérios, e segundo HUGGETT (1996) a forma como uma pessoa define o que é solo pode dar pistas sobre a personalidade de quem elabora a definição. Para fins práticos se adota a definição que solo é um corpo natural dinâmico, trifásico e tridimensional que se forma na superfície da Terra pela ação de cinco fatores de formação incluindo processos biomecânicos de bioturbação e que pode servir de base para o crescimento de plantas (SCHAETZL; ANDERSON, 2005; WEIL; BRADY, 2016). Além disso não se deve deixar de ter em mente que o solo também pode ser visto como um ecossistema (PONGE, 2015).

Um dos componentes do solo é a matéria orgânica. Já seria suficientemente complicado explicar a fração “não viva” desta matéria orgânica, mas temos a fração viva que adiciona múltiplas camadas de complexidade e levanta questões que não são triviais. Esta parte viva abriga vírus, bactérias, fungos, nematóides, colêmbolos, minhocas, formigas e até mamíferos. Parte destes organismos dentre eles as formigas, são capazes de mover solo entre diferentes camadas e promover uma ação onipresente na maioria dos solos promovendo assim a bioturbação descrita de maneira pormenorizada por Charles Darwin no final do século XVIII com outros bioturbadores famosos - as minhocas.

Este capítulo lança luz sobre as *Solenopsis invicta* Buren, conhecidas como formigas de fogo, uma espécie de formiga comum em áreas agrícolas, com ninho conspícuos e conhecida por sua picada e sua habilidade em invadir áreas em diversos países fora de sua área original de distribuição reduzindo a diversidade local de formigas e outros artrópodes. Se aspira que além desses dois fatores negativos se conheça e valorize aspectos positivos da presença de formigas de fogo sendo que este é um passo inicial para a percepção, manutenção e oxalá promoção de serviços ecossistêmicos disponibilizados por estes organismos, que como dito acima são a parte viva da matéria orgânica do solo.

Como este componente vivo representado pelas formigas de fogo influencia o solo onde estas estabelecem seu ninho, quais nutrientes são alterados e qual seria a magnitude desta alteração e suas possíveis causas é o objetivo do estudo apresentado neste capítulo.

2.5 REVISÃO DE LITERATURA

Darwin nos primórdios da Ciência do Solo atribuiu papel importante aos organismos do solo em especial em relação à formação dos horizontes superficiais através da bioturbação (DARWIN, 1881). Estas ideias foram discutidas nas obras de Shaler e de Branner, seguidores de primeira hora das ideias de Darwin sobre formação dos solos (BRANNER, 1909; SHALER, 1891). Na Argentina, estudos de Carlos Bruch também contribuíram para entender a bioturbação promovida por formigas através da escavação de ninhos de diversas espécies (BRUCH, 1917, 1928). Outro artigo contemporâneo destes últimos citados é o de Barbour (BARBOUR, 1897) sobre as *Daemonelix* e suas variações que se tratam de icnofósseis muito bem preservados e abundantes do final do período Terciário presentes em uma formação geológica no estado norteamericano de Nebraska que possibilitou a formação de icnofósseis de carbonato de cálcio através do preenchimento de tocas e ninhos de diversos animais fossoriais, sendo que um de seus tipos foi recentemente associado a ninhos de formigas (SMITH et al., 2011). Após estes estudos do final do século XVIII esta corrente permaneceu latente por muitos anos sendo revisitada a partir da década de 1960 por diversos autores (BAXTER; HOLE, 1967; HOLE, 1981; JOHNSON, 1990; PATON; HUMPHREYS; MITCHELL, 1995) e desde então passaram a ter um maior alcance de divulgação e um acúmulo de informações.

Entende-se por bioturbação no sentido amplo o retrabalho dos solos e sedimentos por todos os tipos de organismos, incluindo micro-organismos, raízes e animais com hábitos de escavação (JOHNSON, 1990). *Stricto sensu*, bioturbação se refere ao incremento na dispersão de partículas resultantes do retrabalho feito por animais escavadores (MEYSMAN; MIDDELBURG; HEIP, 2006). A bioturbação decorre da necessidade dos organismos em buscar alimento, abrigo na matriz do solo e outros fatores essenciais para completar seus ciclos de vida, contribui para a formação do solo e para o funcionamento dos ecossistemas, com reflexos também na alteração da paisagem (JONES, 2012; PHILLIPS, 2009; WILSKE et al., 2015). Desta maneira os ninhos de formigas edáficas são assinaturas químicas e morfológicas da pedoturbação e estão elencados dentre as formas de micro relevo (SCHAETZL; ANDERSON, 2005).

No Brasil, Branner influenciado pelas ideias de Darwin, no trabalho “A geologia do trabalho das formigas nos trópicos” marcou o início dos estudos sobre bioturbação na região neotropical descrevendo em pormenores inúmeros montículos de saúvas e cupins localizados na Bahia e em Minas Gerais (BRANNER, 1910). Considerando apenas o volume do domo ele registrou no sul da Bahia em uma área total de 9 ha o volume de 2225 m³ de terra depositada na superfície. Atualmente, ainda é possível observar as estruturas descritas por Branner em imagens de satélite que se espalham por dezenas de quilômetros na região de Utinga, estado da Bahia (SOUZA; DELABIE, 2016) estas estruturas apresentam extensão comparável a outras estruturas resultantes da bioturbação como os montículos Mima nos Estados Unidos e as redes de túneis de vombates na Austrália (JOHNSON et al., 2006; LOFFLER; MARGULES, 1980). Apesar desse estudo detalhado, já no início da década de 1900, os registros sobre arquitetura de ninhos e movimentação do solo ainda são raros. Recentemente, foram descritos ninhos de *Ectatomma vizzotoi* atingindo 3,6 metros de profundidade no município de Dourados, em Mato Grosso, mas não há no artigo nenhuma descrição do solo onde o ninho foi construído ou menção à classe de solo (VIEIRA; ANTONIALLI-JUNIOR; FERNANDES, 2007). De maneira semelhante foi descrita a arquitetura dos ninhos e a distribuição dos ninhos de *Dinoponera quadriceps* sem menção ao tipo de solo ou as suas características (VASCONCELLOS; SANTANA; SOUZA, 2004). Esses estudos apresentam informações relevantes e úteis sobre a biologia e ecologia destes organismos, mas adicionam evidências à tese de que há falta de interação entre os estudos em ecologia de solo e pedologia, e isto tem prejudicado o avanço de estudos no campo da bioturbação (BOTTINELLI et al., 2015).

Como dito anteriormente os dados de bioturbação são raros no Brasil e pouco menos raros nos Estados Unidos e Austrália. Nos Estados Unidos, Lyford avaliou a importância das formigas que constroem ninhos pequenos na gênese dos solos (LYFORD, 1963). Em seu estudo conduzido na floresta da Universidade de Harvard observando estes ninhos menores, foi registrada atividade de bioturbação na ordem de cerca de 15.000 kg de solo movimentado por hectare. Este material de solo era oriundo especialmente horizonte B, representando o que ele afirmou ser um processo de anti-eluviação. Este fenômeno de anti-eluviação é também descrito por outros autores (BUTLER, 1995). Ainda nos Estados Unidos existem vários estudos de estrutura de ninhos, icnologia e sobre a potencial influência da bioturbação em interferir em métodos de datação de partículas de quartzo (CRONIN et al., 2003; HALFEN; HASIOTIS, 2010; RINK et al., 2013; TSCHINKEL, 2015). Na Austrália, os estudos sobre bioturbação provocada por formigas do gênero *Aphaenogaster* foi tema de revisão (RICHARDS, 2009) e o histórico dos dados disponíveis sobre bioturbação no mundo foi compilado em 1995 e 2009 (PATON; HUMPHREYS; MITCHELL, 1995; WILKINSON; RICHARDS; HUMPHREYS, 2009).

Embora o processo de bioturbação seja pouco enfatizado pelos cientistas de solo ele é onipresente e afeta quase que continuamente a pedogênese, afetando a criação e destruição de horizontes, criando e mantendo macroporos. A tal ponto que pode-se assumir que provavelmente não haja nenhuma rota pedogenética que não seja afetada pela bioturbação (HOLE, 1981; SCHAETZL; ANDERSON, 2005).

Assim sendo, constata-se que a conexão entre a fauna do solo e o mundo mineral é íntima e seu produto pode ser observado por toda a superfície da crosta terrestre (AMUNDSON et al., 2007). Essa interrelação resulta em aceleração do intemperismo pela ação de organismos (BEW – *biologically enhanced weathering* no termo original em inglês, aqui abreviado como IBA referente a intemperismo biologicamente acelerado) que pode ocorrer a partir da ação de plantas, algas, musgos, bactérias e formigas do solo dentre outros organismos (DORN, 2014; HASIOTIS; HALFEN, 2010; HUANG et al., 2014; JACKSON, 2015; TZIPERMAN et al., 2011). De modo mais amplo a ação da biota sobre o intemperismo ao longo da história do planeta foi preponderante para seu resfriamento do planeta e habitabilidade, estando intimamente ligada aos teores atuais de CO₂ na atmosfera e nos oceanos (AMUNDSON et al., 2007; SCHWARTZMAN; VOLK, 1989; TZIPERMAN et al., 2011).

Já foi demonstrado em estudo de longa duração que a aceleração do intemperismo de cristais de olivina e plagioclásio mediado pela ação de formigas é notável e pode superar em muito a ação de fungos micorrízicos e cupins (DORN, 2014). Assim sendo, as formigas devem ser consideradas como integrantes dos sistemas biológicos de regulação junto com outros organismos do solo participando na mediação da decomposição dentre outros processos (LAVELLE et al., 1992).

Durante as atividades de construção e manutenção de ninhos, as formigas criam domos na superfície, compostos por solo oriundo de diversas e tendem a conter restos de presas e excretas. É de se esperar, portanto, o acúmulo de nutrientes, alteração na granulometria e possivelmente na atividade microbiológica dentre outras (NKEM et al., 2000). Em ninhos de *Pheidole* se observou uma série de modificações em relação ao solo próximo aos ninhos: aumento na concentração de C, N e P totais; aumento de NO₃⁻, aumento na capacidade de retenção de água do solo e alteração do pH para condições mais alcalinas (SHUKLA et al., 2013). Estas e outras alterações significativas no solo já foram descritas para algumas espécies de formiga como moderação de pH, enriquecimento do solo com nitrogênio, incremento de porosidade, regulação da distribuição de organismos do solo, aumento nas concentrações de nutrientes (P, Na, K, Ca e Mg) e facilitação da sucessão vegetal (DEL TORO; RIBBONS; PELINI, 2012). Solos modificados por formigas quase invariavelmente contêm incremento nos níveis de nutrientes como C orgânico, P e N; embora esse aumento por vezes seja pequeno,

quando ocorre as maiores concentrações desses nutrientes podem perdurar por anos (CLAY et al., 2013; DEFAUW; VOGT; BOYKIN, 2008; LOBRY DE BRUYN, 1999; PINKALSKI et al., 2015; VIDKJÆR et al., 2015).

Em geral os estudos descritos acima abordam a dinâmica de macronutrientes que participam da constituição de aminoácidos, da clorofila e de outros compostos sem os quais as plantas não podem completar seu ciclo, sendo assim considerados essenciais (MARSCHNER, 2011). Nota-se, porém, que aparentemente não há registro na literatura sobre a interação entre ninhos de formiga e dinâmica de um importante macronutriente: o silício. O silício a princípio está fora do rol dos macronutrientes essenciais e é o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre, estando atrás apenas do oxigênio, e pode ser considerado elemento benéfico para as plantas (EPSTEIN, 1999). Seus estoques estão divididos em três compartimentos ou fases: minerais primários, minerais secundários e secundários microcristalinos, o que incluiria também o silício precipitado como sílica amorfa (SOMMER et al., 2006).

Apesar de estar em grande quantidade na crosta apenas pequena fração do silício participa dos ciclos biogeoquímicos e é prontamente disponível para as plantas na forma de polímero dissolvido na solução do solo ou adsorvido nas argilas (CONLEY, 2002; YI et al., 2018). Este polímero se comporta como ácido fraco sem carga elétrica, o ácido silícico (H_4SiO_4), sendo solúvel em água na maioria das faixas de pH dos solos, mais especificamente em solos com pH abaixo de 7 (CAMARGO; KORNDÖRFER; PEREIRA, 2007; WEIL; BRADY, 2016).

A exceção dos fitólitos não silicosos como o oxalato de cálcio, os fitólitos são biossílica em forma sólida, que é formada nas plantas com a deposição do silício após a evaporação da água e que preservam o formato da célula dissecada (SOMMER et al., 2006). Sendo assim se tornam uma fonte de silício que pode ter sua origem ligada ao grupo de plantas nos quais se originou; assim é possível, por exemplo, distinguir com técnicas de microscopia se os fitólitos tem origens em plantas de Poaceae, de Eudicotyledonae, Cyperaceae ou de Arecaceae (CALEGARI et al., 2013). Os fitólitos tendem a se acumular nas camadas mais superficiais do solo, mas podem ter sua distribuição alterada pela bioturbação e pelas práticas de mecanização para preparo do solo (GOLYEVA, 2001).

Notadamente, o silício pode ser usado por diversas plantas como alternativa de bom custo-benefício frente à lignina e que além de fornecer estrutura para as plantas fornece ainda defesa contra herbivoria (STRÖMBERG; DI STILIO; SONG, 2016). Os efeitos do silício sobre insetos folívoros incluem o desgaste das peças bucais e alteração na taxa de consumo relativo devido à dificuldade de digestão e a redução na absorção de nitrogênio, o que retarda o crescimento das formas imaturas e aumenta o período de exposição aos predadores (MASSEY; ENNOS; HARTLEY, 2006; MASSEY; HARTLEY, 2009; NABITY et al., 2012). O enriquecimento experimental de silício em plantas cultivadas como o milho e o arroz pode acarretar uma série de outras alterações em potenciais insetos praga; como exemplos o aumento da mortalidade de larvas e pupas, a redução do período de oviposição e a redução do peso das larvas (LIANG et al., 2015a).

O silício é capaz de produzir efeitos como aumento na quantidade de clorofila e antocianina, assim como no aumento do volume de raízes e na melhora da resistência de plantas a doenças e a stress hídrico, pode suprimir diversas pragas, gera proteção contra diversos stress abióticos e contra a toxidez por Mn e sua adição como fertilizante pode ter os mesmos níveis de controle de doenças fúngicas obtidos ao se aplicar um fungicida (BROADLEY et al., 2011; HU et al., 2018a; YI et al., 2018). Alguns autores, porém, são categóricos e elevam o silício a uma condição de elemento agronomicamente essencial para o arroz no sentido de que a planta com carência de Si pode completar seu ciclo porém apresentando uma série de alterações e redução sensível no volume e na qualidade dos grãos produzidos (MA; TAKAHASHI, 2002). As correntes mais modernas assumem o Si como elemento *quasi*-essencial ou como elemento

benéfico (WEIL; BRADY, 2016), existindo ainda autores que são enfáticos em dizer que os critérios de essencialidade são débeis (STREET-PERROTT; BARKER, 2008), ou seja, não seriam adequados, em parte por serem estudos visando a formulação de adubos (KIRKBY, 2011).

Ainda não se conseguiu induzir metodologicamente a carência absoluta de silício e, em face a inúmeras evidências práticas e as quantidades absorvidas por diversas plantas, EPSTEIN (1999) argumenta que o Si deva ser considerado elemento essencial. O mesmo autor chega ainda a pedir licença ao estadista Winston Churchill ao parafraseá-lo dizendo que: “*a bioquímica do Si é uma charada envelopada em um mistério dentro de um enigma*”. Tal dificuldade seria fruto em parte do desinteresse em geral em se esmiuçar os diferentes mecanismos envolvidos na biogeoquímica do silício, que por sua vez seria consequência do foco dos estudos agrônômicos, que, via de regra visam gerar dados para subsidiar a formulação e aplicação de adubos (EPSTEIN, 1999).

A lista de plantas reconhecidamente beneficiadas pelo Si inclui o algodão (*Gossypum* sp.), a cana-de-açúcar (*Sacharum* sp.), a videira (*Vitis* sp.), o arroz (*Oryza* sp.), abóbora (*Cucurbita* sp.) e Pinus (*Pinus taeda*) (EPSTEIN, 1999; LIANG et al., 2015a; YAN et al., 2018). Os benefícios incluem resistência sistêmica adquirida, melhor alongamento das fibras em especial nas variedades de algodão de fibra longa, plantas de cana e de arroz mais eretas, redução do acamamento de plantas de arroz, maior resistência a fungos de parte aérea em abóbora e um aumento de 50% na atividade da rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) em plantas de abóbora submetidas experimentalmente a maiores quantidades de silício, podendo ainda ocorrer redução dos efeitos da toxidez por Fe, Cd, As, Mn e Al e aumentar a eficiência da absorção de K, P e Ca e alívio do estresse provocado por salinidade (EPSTEIN, 1999; WEIL; BRADY, 2016).

2.6 MATERIAL E MÉTODOS

2.6.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica – SIPA (Fazendinha Agroecológica km 47), localizada em Seropédica, RJ (latitude 22° 45' S, longitude 43° 41' N e altitude que varia entre 30 e 70 m). A área do SIPA é de cerca de 70 hectares, possui relevo suave ondulado e ondulado e os solos são classificados como ARGISSOLOS e PLANOSSOLOS (NEVES et al., 2005, SANTOS et al., 1999). O SIPA faz parte de uma iniciativa conjunta da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-Rio), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e do Colégio Técnico Agrícola da UFRRJ (CTUR). Foi criado em 1993 com a finalidade de abrir espaço para o exercício da agroecologia em bases científicas, explorando as potencialidades locais, dentro de uma estratégia que visa contribuir para dar sustentabilidade à atividade produtiva no meio rural, integrando a produção vegetal e animal (NEVES et al., 2005).

O SIPA hospeda grande diversidade de plantas cultivadas incluindo variedades hortícolas, frutíferas anuais e perenes, faixas de árvores leguminosas ou de palmeiras (coco, pupunha) e pastagem. O manejo orgânico é preconizado desde o início da iniciativa não sendo utilizados adubos sintéticos ou agrotóxicos desde a implantação da área em 1993. A área de onde se obteve as amostras de solo e de fauna corresponde a parte do SIPA, totalizando 4,6 hectares, localizada em áreas de produção agrícola e tendo sido excluídos usos com pastagens, cobertura florestal ou arbustiva, exceto no caso do plantio de café (Figuras 1 e 2). Foi predeterminado que a distância mínima entre ninhos a serem coletados seria de 5 metros; porém, a menor distância observada a campo dentre os ninhos amostrados foi de 9 metros, para os ninhos 29 e 22.



Figura 1. Croqui da área de amostragem dos ninhos de formigas, inserida na área da SIPA. Imagem: Google Earth, croqui gerado no QGIS.



Figura 2. Margem de área cultivada em pousio com um típico ninho de *Solenopsis invicta* Buren em primeiro plano contendo uma marcação que foi instalada durante o mapeamento dos ninhos.

2.6.2 Atributos físicos e químicos do solo

Nesse estudo foram avaliadas as alterações no solo provocadas pela bioturbação decorrente da escavação de ninhos de *Solenopsis invicta* (Buren), também conhecidas como formigas de fogo ou lava pé, no agroecossistema da Fazendinha Agroecológica do Km 47 (SIPA). Os parâmetros de solo escolhidos foram os mesmos usualmente avaliados em análises químicas de rotina e sendo também avaliada a massa de solo movimentado (descrita abaixo) e a alteração na quantidade de silício biodisponível.

A amostragem de material de solo dos ninhos e de solo testemunha, para a análise das características físicas e químicas foi feita coletando-se todo o material do ninho acima do nível do solo (identificado como domo) (Figuras 3 e 4); além de uma amostra composta de material de solo em uma distância média de 3 metros do ninho (3 sub-amostras para cada amostra composta) na uma profundidade de 0 a 20 cm (camada arável) (Figura 5). Assim sendo, todos os valores foram obtidos para um conjunto de 30 pares de amostras, sendo uma do solo do domo dos ninhos e outra por uma amostra composta do material de solo adjacente aos ninhos coletados na área de 4,6 ha destacada na Figura 1.



Figura 3. Solo superficial dos ninhos ainda com as operárias e imaturos. As amostras foram mantidas abertas na casa de vegetação possibilitando o escape dos animais.

Em conjunto com o material do solo também se encontravam formigas vivas. Após a etapa de coleta as amostras foram dispostas em bandejas plásticas em casa de vegetação para permitir o escape das formigas. As amostras permaneceram na casa de vegetação por 48 horas, sendo revolvidas para evitar que as formigas se alojassem na parte inferior da massa de solo e também para que pudessem sair da amostra coletada (DEFAUW; VOGT; BOYKIN, 2008). As operárias que porventura permaneceram ao final da secagem foram removidas com pinça entomológica e descartadas. Após a secagem, as amostras foram pesadas, destorroadas e passadas por peneira de 2,00 mm de malha, obtendo-se assim a terra fina seca ao ar (TFSA) utilizada para as análises físicas e químicas (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Amostra de solo do ninho após a saída dos animais sendo exposta para secagem ao ar visando obter a alíquota para as análises químicas de solo e de fitólitos.



Figura 5. Conjunto de amostras de solo do ninho e solo testemunha sendo expostas para secagem ao ar visando obter a alíquota para as análises químicas de solo e de fitólitos.

Os atributos químicos avaliados foram os valores de pH em água (relação solo solução (1:2,5), os teores de bases trocáveis (Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+} e Na^{+}), Al^{+3} trocável, acidez potencial (H^{+} + Al) e o P disponível (Teixeira et al., 2017). A partir dos resultados foram calculados: soma de bases ($S = \text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{+}$), capacidade de troca catiônica ($T = S + \text{H} + \text{Al}$) e saturação por bases ($V\% = S/T \times 100$). O carbono orgânico total (COT) foi determinado pelo método de Walkley e Black modificado (TEDESCO et al., 1995), e o nitrogênio total (NT) utilizando o método de destilação de Kjeldahl (HILDEBRAND, 1976).

Dada a complexidade das análises o silício é tratado em separado dos demais parâmetros químicos uma vez que inclui a análise de fitólitos.

Os parâmetros químicos foram analisados no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia (LQA/Agrobiologia) segundo o protocolo em uso no laboratório (NOGUEIRA et al., 2005).

A granulometria das amostras de solo no domo dos ninhos foi analisada no laboratório de Física do Solo da UFRJ utilizando o método de análise granulométrica (TEIXEIRA et al., 2017). Também foi registrado o peso da terra do domo, o qual é considerado como indicador da atividade acumulada do ninho e de seu número de operárias.

2.6.3 Extração e identificação de fitólitos

De posse da TFSA das amostras dos domos de 30 ninhos de *Solenopsis invicta* (BUREN, 1972) e de material de solo próximo aos ninhos foram conduzidas as operações de extração de fitólitos. Os fitólitos nas amostras foram extraídos conforme o Método 2, descrito em Calegari et al. (2013). Os morfotipos foram identificados em lâminas confeccionadas com a fração resultante da extração e observados em magnificação de 40X, em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 no Laboratório de Gênese e Classificação do Solo LGCS – UFRJ pelo Engenheiro Agrônomo e Mestre em Ciência do Solo Eduardo Neto. Em cada lâmina foram

contados, no mínimo, 200 fitólitos com significado taxonômico e/ou ambiental, identificados conforme o International Code for Phytolith Nomenclature – ICPN (NEUMANN et al., 2019). O número de fitólitos foi calculado de acordo com Albert e Weiner (2001).

A extração de fitólitos de amostras de solo e sedimento é baseada em uma série de pré-tratamentos seguindo procedimentos clássicos de remoção dos óxidos, carbonatos e matéria orgânica, conforme Mehra e Jackson (1960). A matéria orgânica e os óxidos de ferro foram removidos com peróxido de hidrogênio 30% e ditionito-citrato-bicarbonato, respectivamente. Em seguida, a separação dos fitólitos foi realizada com politungstato de sódio com densidade de $2,35 \text{ g.cm}^{-3}$. Os procedimentos específicos de separação dos silicofitólitos usados nesse estudo são descritos por Calegari et al. (2013).

2.6.4 Identificação de formigas

Os indivíduos, em sua maioria operárias (Figura 6), foram coletados e armazenados em álcool a 70%. Foram utilizadas chaves taxonômicas, lupa (microscópio estereoscópico 40x) para identificação das formigas coletadas (BACCARO et al., 2015; PACHECO; MACKAY, 2013). O material testemunha foi temporariamente armazenado em via úmida no Laboratório de Fauna do Solo da Embrapa Agrobiologia para eventuais análises adicionais.



Figura 6. Operária de *Solenopsis invicta* Buren (ANTWEB, 2023).

2.6.5 Análises estatísticas

Com o uso do software livre R 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018) foram feitos testes de normalidade dos dados e os demais testes estatísticos. Foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para testar a normalidade dos dados, alguns dos parâmetros não apresentaram comportamento normal, assim sendo foi utilizado a análise não paramétrica para a análise de todos os dados. Para tal foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado. Os dados relativos aos teores de silício e fitólitos apresentaram distribuição normal e foram submetidos ao Teste t pareado. Se testou as diferentes variáveis tendo como comparação o material de solo dos domos dos ninhos e o das amostras compostas de solo superficial adjacente tomadas como referência. Os parâmetros testados foram %C, Al, Ca, H+Al, K, Mg, N, P, pH, Valor S, Valor T, Valor V%, COT, MOS, PASi, ASi, AIF, Fitólitos de Poaceae, Fitólitos de Eudicotyledonae, Fitólitos de Arecaceae, Fitólitos de Cyperaceae.

2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso da terra dos domos dos ninhos variou de 0,365 kg a 8,68 kg com valor médio de 2,67 kg de solo movimentado (Figura 7). Se for considerada o valor médio de 74 ninhos por hectare que corresponde a dados obtidos por outros autores na área onde foi realizada a coleta (ALMEIDA et al., 2007) teríamos a estimativa de movimentação de solo da ordem de 200 kg de solo por hectare.

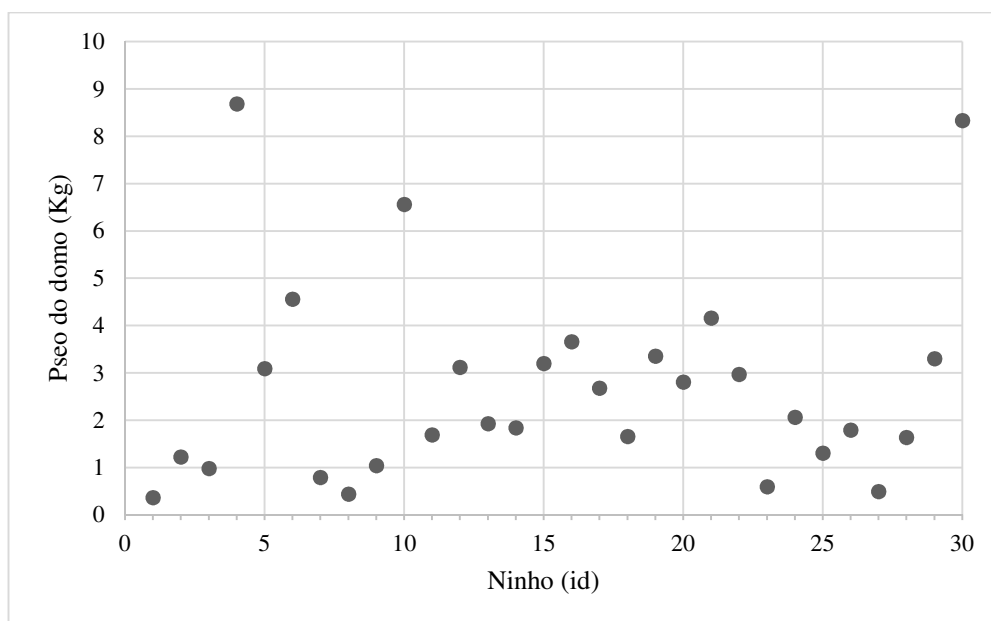


Figura 7. Valores do peso do domo dos 30 ninhos utilizados para as análises químicas e fitólitos (peso médio = 2,67 kg).

Os ninhos apresentavam menor participação da fração argila em sua composição (Figura 8) e incremento proporcional de areia grossa (Figura 9). As formigas tendem a selecionar o material para construção de seus ninhos e transportá-los no perfil de acordo com suas necessidades inclusive abrindo e preenchendo galerias em desuso (HALFEN; HASIOTIS, 2010).

No caso de *Solenopsis invicta* a parte aparente do ninho acima do nível “médio” do solo é funcional, não se tratando apenas de material de solo movimentado e depositado na superfície, sendo assim é classificado como um ninho tipo II (PATON; HUMPHREYS; MITCHELL, 1995). Segundo os mesmos autores, ninhos tipo II por terem estruturas como por exemplo câmaras com formas imaturas tendem a ser mais resistentes à erosão e teriam atividade pedogenética menor que os ninhos tipo I (PATON; HUMPHREYS; MITCHELL, 1995). Deve se observar que alguns estudos apontam para gradação da atividade pedogenética mais pronunciada em ninhos que duram períodos mais extensos como os de *Formica* (FROUZ; KALČÍK; CUDLÍN, 2005) e menos pronunciada em ninhos que tem período de utilização menor como ocorre com *Solenopsis* (TSCHINKEL, 1993). Logo, estes últimos estando mais sujeitos a serem abandonados e erodidos apresentariam comportamento intermediário entre os dois tipos. A necessidade de utilizar o solo como extensão de seu fenótipo (PHILLIPS, 2009) e a necessidade e capacidade de mover seletivamente partículas de solo com diferentes tamanhos neste caso se traduz no acúmulo de areia grossa na superfície e na redução na participação da fração argila (GABET; REICHMAN; SEABLOOM, 2003). Esta ação ao longo do tempo geológico tem consequências nas características do solo que coevolui com os organismos que nele habitam (JOHNSON; WATSON-STEGNER, 1987). Neste caso a consequência mais

evidente seria acúmulo de areia grossa na superfície e a tendência ao longo do tempo à formação de gradiente textural abaixo do limite de exploração do corpo do solo pelas formigas.

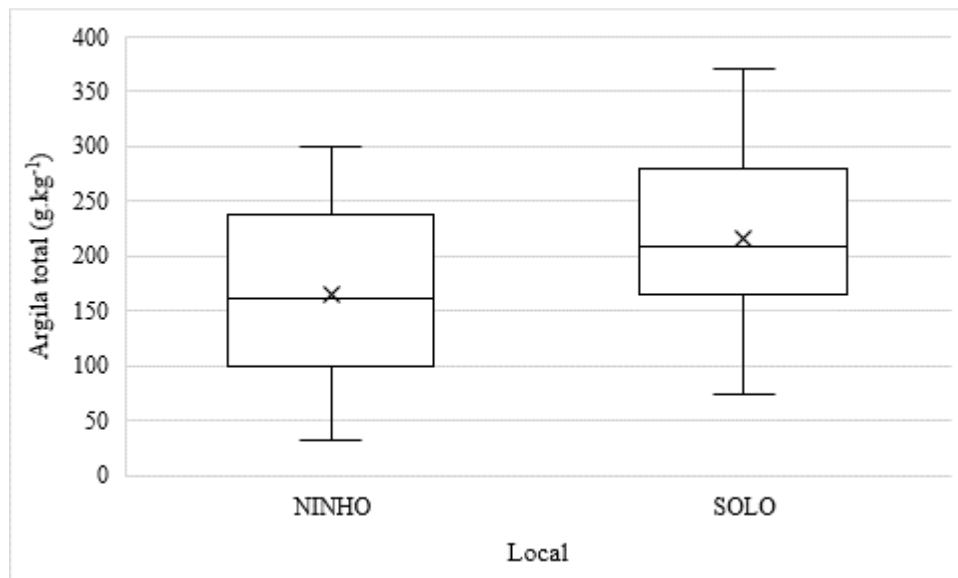


Figura 8. Distribuição dos dados da fração granulométrica correspondente ao teor de Argila Total no domo dos ninhos e no material de solo testemunha ($p < 0,0002$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

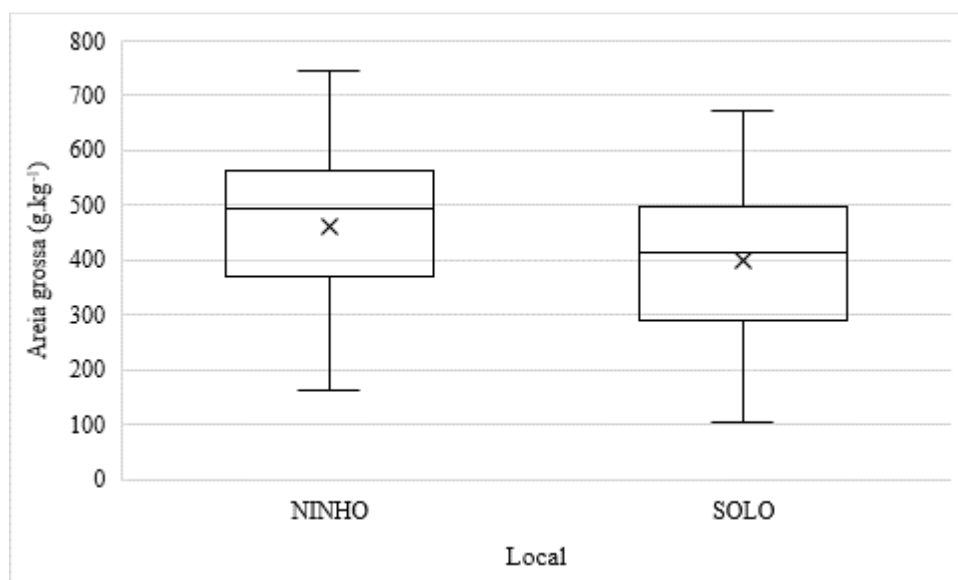


Figura 9. Distribuição dos dados da fração granulométrica correspondente a Areia grossa no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,00175$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

Foi observado menor valor de acidez total nos domos dos ninhos, maior concentração de potássio e de fósforo e maior saturação de bases (V%). Estes resultados coadunam com observações semelhantes feitas em ninhos de outras espécies (DEFAUW; VOGT; BOYKIN, 2008; FARJI-BRENER; WERENKRAUT, 2017; SHUKLA et al., 2013). A redução média do valor de acidez total nos ninhos foi de $0,69 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ em relação ao material de solo adjacente (Figura 10), porém não há mudança significativa no valor de pH ($p = 0,8457$). A possível razão para estes valores é discutida em conjunto com os demais dados mais adiante.

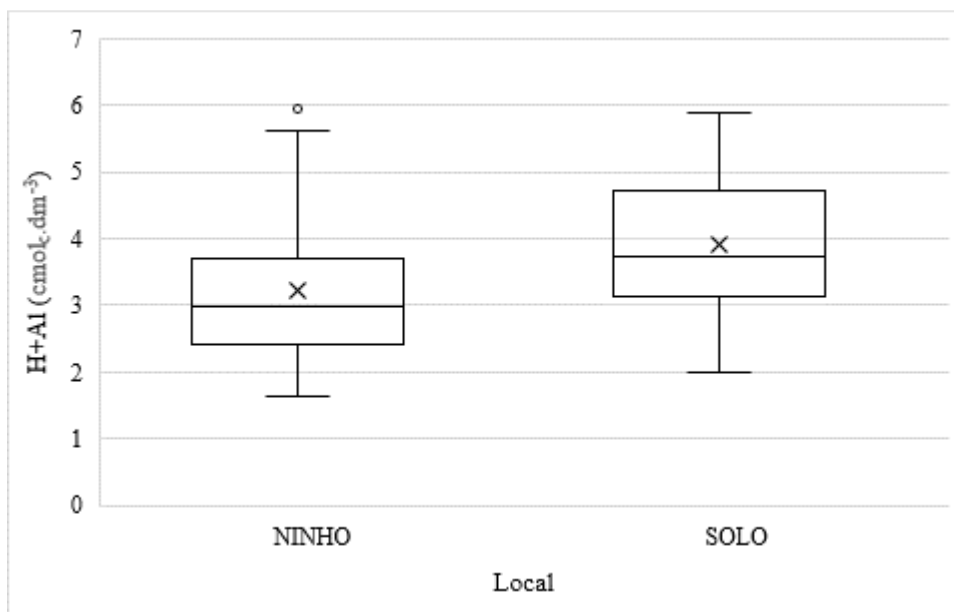


Figura 10. Distribuição dos valores de Acidez Total ($H+Al$) em $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p = 0,00014$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os outliers (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

O potássio é absorvido em grande quantidade pelas plantas e participa da ativação de enzimas, fotossíntese e síntese proteica sendo passível de ser absorvido apenas quando está na solução do solo, o que corresponde geralmente a menos de 10% do potássio existente nos solos (MANNING, 2010). O incremento de potássio (Figura 11), que quando está na sua forma trocável está retido nos argilominerais, ocorreu mesmo com a redução do teor da fração argila nos domos dos ninhos (Figura 8) e isto pode estar relacionado a presença de bactérias com capacidade de solubilizar potássio (BAHADUR et al., 2019). Um dos mecanismos de solubilização de fósforo e potássio por bactérias é a produção de polissacarídeos com radicais carboxila livres que causam quelação e consequente desintegração de minerais que possuem fósforo e potássio em sua constituição (BAHADUR et al., 2019). Esta possibilidade se baseia nos dados apresentados no capítulo II desta tese, em que se detectou a presença de diversas bactérias promotoras de crescimento (PGPR) associadas a *Solenopsis invicta*, dentre elas bactérias de unidades taxonômicas atribuídas a gêneros com espécies com capacidade reconhecida de solubilização: *Pseudomonas* e *Bacillus*.

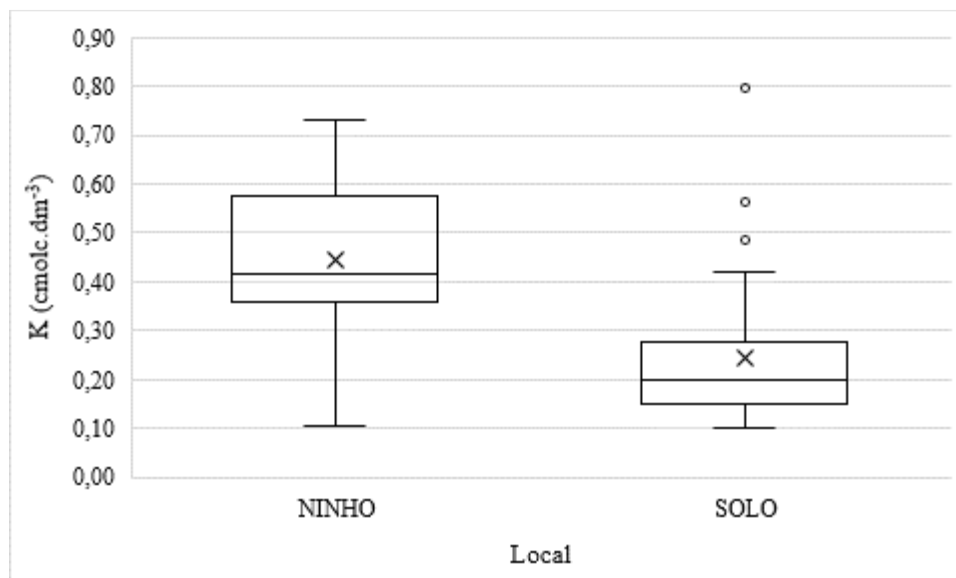


Figura 11. Distribuição dos dados de Potássio (K) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os outliers (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

Tanto o potássio como o fósforo (Figuras 11 e 12) podem ter sua disponibilidade aumentada por influência de intemperismo biologicamente acelerado (IBA) pela ação das formigas (DORN, 2014), que pode ainda ser intermediado pela ação de bactérias solubilizadora, como já citado. Outros insetos também tem esta capacidade, inclusive formas imaturas de Lepidoptera, que aumentam a liberação de fósforo e potássio acelerando a mineralização da serrapilheira (SMITH, 2007). O aporte de presas e outros materiais coletados como seiva exsudada de insetos sugadores (*honeydew*) e sementes pode ser fonte de nutrientes que passariam a ser disponibilizados por ação do IBA (FROUZ; JILKOVÁ, 2008). A homeostase estequiométrica dos insetos fitófagos, que figuram dentre as presas de *S. invicta*, tende a seguir a disponibilidade de nutrientes (BERTRAM et al., 2008). Logo, plantas enriquecidas com fósforo podem oferecer dieta rica neste elemento que irá se refletir em maior conteúdo de fósforo no corpo dos insetos fitófagos (BERTRAM et al., 2008) e, conseqüentemente, incrementando a possibilidade de acúmulo deste ou de outro nutriente no solo do ninho e também no corpo das formigas, inclusive alterando sua assinatura isotópica (TILLBERG et al., 2006).

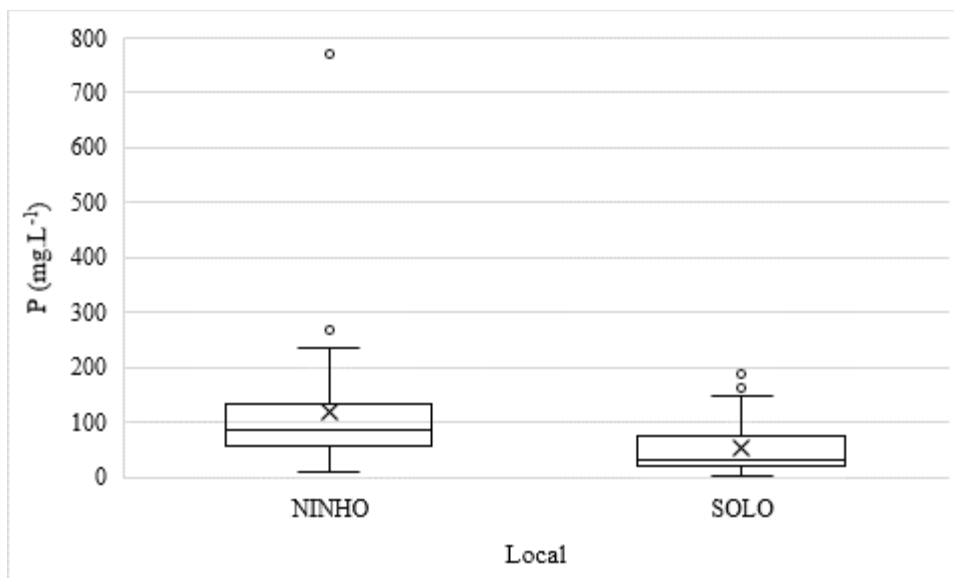


Figura 12. Distribuição dos dados de concentração de Fósforo (P) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p = 0,018$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os *outliers* (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

O aumento do valor V% dos solos dos domos dos ninhos (Figura 13) está relacionado ao incremento dos valores de potássio e ao decréscimo dos valores de acidez total em relação ao material de solo circundante, não sendo observada diferença nos teores de cálcio e magnésio.

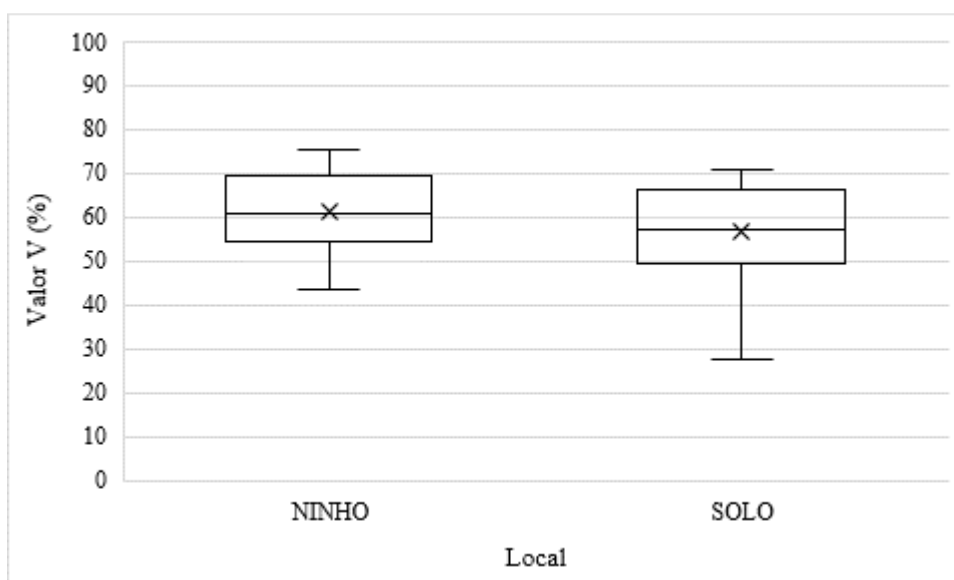


Figura 13. Distribuição dos dados de Valor V% no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

Foi detectado incremento de carbono orgânico total ($p < 0,0001$) (Figura 14) que pode ter origem na deposição de carcaças de presas e de dejetos da própria colônia de formigas (CLAY et al., 2013; FARJI-BRENER; WERENKRAUT, 2017; SHUKLA et al., 2013). O acúmulo lento e gradual de carbono no solo promovido pela fauna é de grande importância para o funcionamento do solo influenciando os processos de decomposição e a nutrição de plantas, assim como para o balanço de carbono no solo (COLEMAN; ZHANG; FU, 2014). Os mesmos autores destacam a formação de “canais de energia” derivados de caminhos tróficos dominantes que causam o acúmulo de nutrientes e energia modulando assim a microbiota e alterando a teia alimentar do solo (COLEMAN; ZHANG; FU, 2014). Esses efeitos que extrapolam as relações meramente tróficas estão dentre aqueles que definem as formigas e outros organismos como engenheiros do ecossistema (JONES, 2012; JONES; LAWREN; SHACHAK, 1997; JOUQUET et al., 2006).

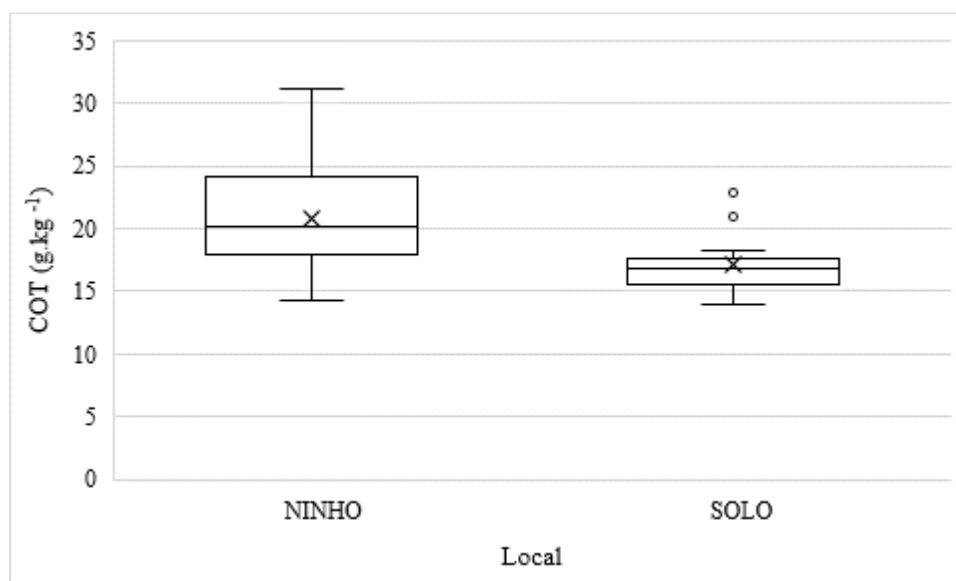


Figura 14. Distribuição dos dados de Carbono Orgânico Total (COT) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$). As barras indicam os valores mínimos e máximos sem os *outliers* (representado por um ponto “o”), a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

A matéria orgânica do solo assim como o carbono nela contido são essenciais para a saúde do solo (DORAN; ZEISS, 2000). As implicações da dinâmica do carbono nos solos extrapolam sua importância agrícola pois sendo estes grande reservatório de carbono, alterações no estoque de carbono do solo podem impactar positiva ou negativamente no comportamento do clima do planeta (LAL, 2020). Grande parte da capacidade de troca catiônica dos solos e da capacidade de retenção de água está baseada na matéria orgânica e sua dinâmica está intimamente relacionada com a formação e estabilidade de agregados (WEIL; BRADY, 2016). Os agregados por sua vez, especialmente os microagregados, são responsáveis pela oclusão do carbono, protegendo-o da ação das bactérias que o usam como fonte de energia o que resulta em sua saída do sistema via respiração (SIX et al., 2004).

A assembleia de fitólitos é alterada pelos ninhos (Figura 15). Os fitólitos de Poaceae percentualmente dominam tanto o material de solo superficial adjacente aos ninhos, perfazendo em média 83,21% dos fitólitos no solo, quanto o solo dos domos dos ninhos, onde é reduzido para valor médio de 62,64% do total. As áreas entre os cultivos no SIPA são mantidas com

cobertura viva, sendo dominada por gramíneas. A maioria dos ninhos coletados estava localizada nas margens dos cultivos, logo estão inseridos nesta matriz.

Os fitólitos de dicotiledôneas apresentam incremento nos ninhos em relação ao encontrado no material de solo adjacente. Os fitólitos de dicotiledôneas que no solo tem valor médio de 11,67% passam a representar em média 33,08% do total de fitólitos nos ninhos. Deve ser ressaltado que as gramíneas tendem a ser eficientes acumuladoras de silício (YAN et al., 2018). Logo, para ocorrer aumento na proporção de fitólitos de dicotiledôneas, que na área de estudo incluem além das árvores os cultivos hortícolas, ao menos em teoria, material oriundo de dicotiledôneas no ninho deve ser adicionado em uma razão maior e a princípio desconhecida do que a de gramíneas, para que ocorra mudança percentual perceptível.

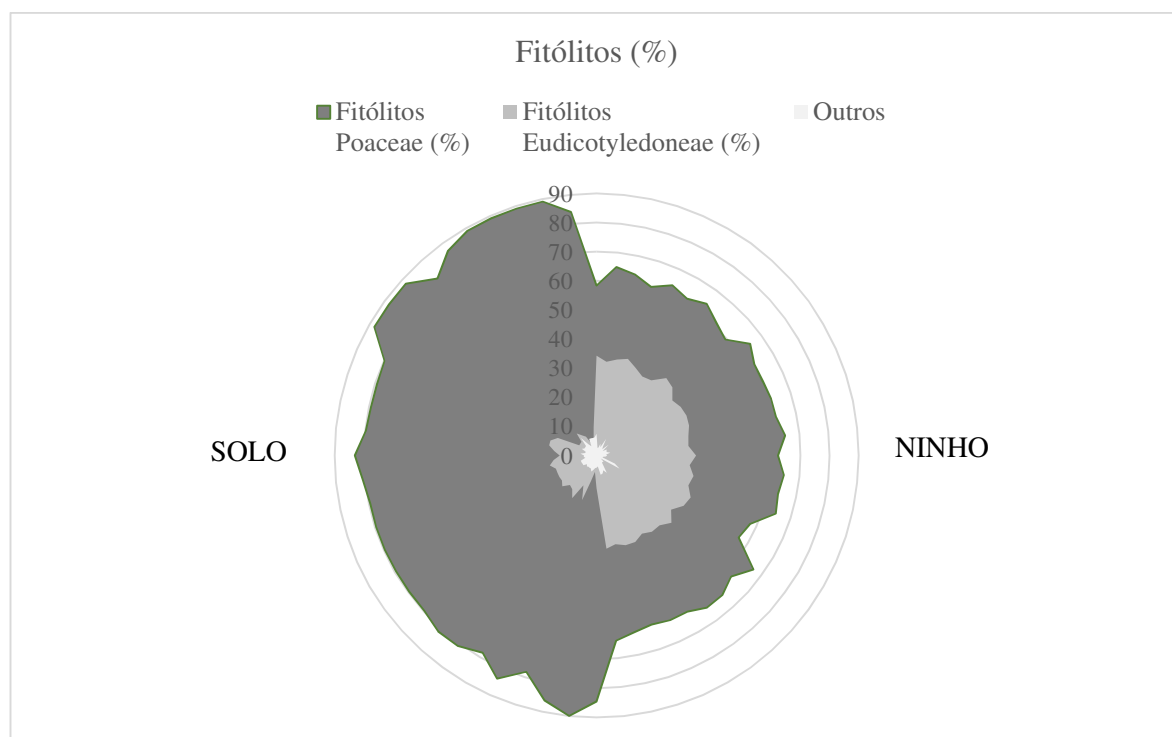


Figura 15. Composição percentual dos tipos de fitólitos no solo e nos ninhos tendo sido registrada diferença para Fitólitos de Poaceae e Eudicotyledoneae ($p < 0,0001$), o campo “outros” representa os fitólitos de Cyperaceae e Arecaceae. Se observou diferença para Fitólitos de Cyperaceae ($p = 0,0004$) não havendo diferença para fitótilos de Arecaceae ($p = 0,4569$).

Os morfotipos mais abundantes foram os *elongates*, *hair cells* e *bulliforms*, todos sem significado taxonômico, por serem produzidos por todas as subfamílias das gramíneas (BARBONI; BREMOND; BONNEFILLE, 2007). Também foram observados morfotipos produzidos pelas subfamílias Pooideae (*Rondel* e *Trapeziform*) (TWISS, 1992), Panicoideae (*Bilobate* e *Cross*) (BREMOND et al., 2005), Chloridoideae (*Saddle*) (TWISS, 1992) e Bambusoid (*Cuneiform echinate bulliform*) (MONTTI et al., 2009). Morfotipos produzidos por Eudicotyledoneae (*Block*, *Globular Psilate* e *Globular Rugose*) (BREMOND et al., 2005; PIPERNO, 2006) foram observados em maior proporção nos ninhos, representando entre 31,1 a 35,7 % ($33,1 \pm 1,1\%$), enquanto no solo adjacente corresponderam entre 4,7 a 16,9 % ($11,9 \pm 3,4\%$). Outros morfotipos identificados incluem as famílias Arecaceae (*Globular echinate*) (ALEXANDRE et al., 1999; BARBONI; BREMOND; BONNEFILLE, 2007; PIPERNO, 2006) e Cyperaceae (*Papillae*) (PIPERNO, 2006), com valores entre 0,3 e 7,6 % ($2,5 \pm 1,2\%$).

e 0,8 e 4,4 % ($1,8 \pm 0,7\%$) no solo dos ninhos, e entre 1,1 e 5,5 % ($2,6 \pm 0,7\%$), e 1,5 e 3,1 % ($2,4 \pm 0,3\%$) no solo adjacente, respectivamente (Figura 16).

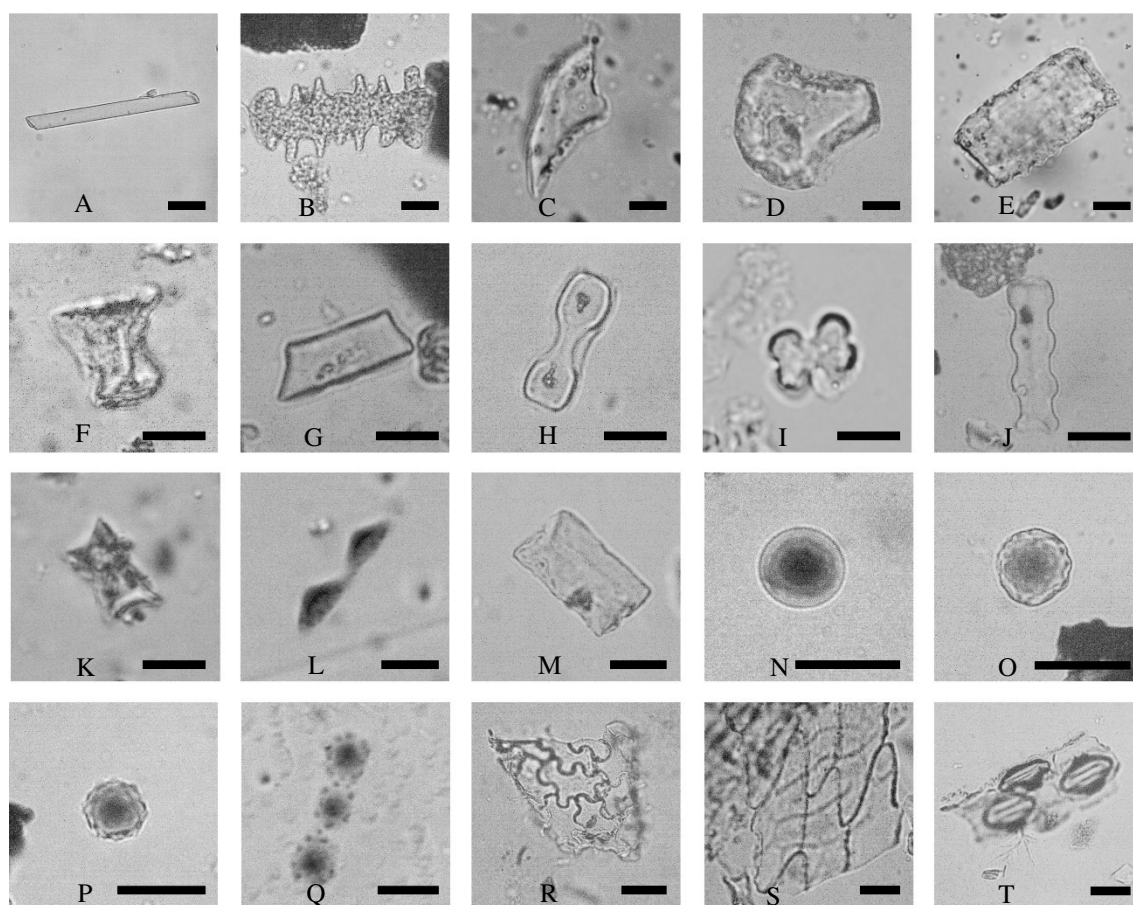


Figura 16. Morfotipos de fitólitos (A) *Elongate psilate*; (B) *Elongate echinate*; (C) Acicular hair cell; (D) *Cuneiform bulliform*; (E) *Parallelepipedal bulliform*; (F) Rondel; (G) Trapeziform; (H) Bilobate; (I) Cross; (J) Polylobate; (K) Saddle; (L) Cone shape; (M) Block; (N) Globular psilate; (O) Globular rugose; (P) Globular echinate; (Q) Articulado globular echinate; (R) Articulado puzzle; (S) Articulado epidermic cells; (T) Articulado stomatic cells. As barras pretas correspondem a escala 10 μ m. Fotos: Eduardo Neto.

O aumento significativo na representação de fitólitos de dicotiledôneas no solo dos ninhos apesar da constância do domínio de fitólitos de Poaceae pode ter origem nas presas e exsudatos coletados por *S. invicta*. A habilidade de predação das formigas de fogo que inclui a captura de imaturos de insetos folívoros é notável e há uma tendência de que sejam coletados mais insetos com potencial de se tornarem praga do que insetos benéficos (EUBANKS, 2001; STILES; JONES, 2001; VOGT et al., 2001). Estes imaturos consomem material vegetal e neste material possui dentre os constituintes, silício na forma de fitólitos os quais se advoga atuam como defesa contra herbivoria (LIANG et al., 2015b). Como os cultivos hortícolas presentes na área são majoritariamente eudicotiledôneas a predação de insetos folívoros ou sugadores nas áreas de cultivo podem explicar o incremento percentual de fitólitos deste grupo botânico nos ninhos. Talvez esta também seja a explicação para o incremento da quantidade total de fitólitos na forma de silício disponível para as plantas e sílica amorfa (PASi e ASi, Figuras 17 e 18) e pode, ao menos em parte, ser a explicação para o incremento de potássio, fósforo e carbono orgânico total. Desta forma as *Solenopsis* agiriam como um vetor biológico de nutrientes (*sensu* BILDSTEIN; BLOOD; FREDERICK, 1992).

Essa explicação encontra paralelo nos fluxos de P disponível medidos em plantação de pinheiros no sul da República Tcheca que mostram a participação significativa de presas e exsudados de homópteras coletados por *Formica polyctena* FOERST neste ambiente, atingindo valores com ordem de grandeza semelhantes aos encontrados para a queda de liteira (FROUZ; JILKOVÁ, 2008; FROUZ; ŠANTRŮČKOVÁ; KALČÍK, 1997). Entretanto não foram encontrados registros na literatura sobre quantidades ou mesmo presença de fitólitos no trato digestivo de insetos herbívoros tratando-se portanto de extrapolação de informações já confirmadas para vertebrados (STRÖMBERG et al., 2018). Geralmente se observa a incorporação de fitólitos aos solos quando a serapilheira e as plantas se decompõem na superfície, ou no subsolo, no caso de raízes e rizomas. Especificamente, na parte superior do solo, a mineralização da matéria orgânica mediada biologicamente ocorre rapidamente e os fitólitos mais solúveis são dissolvidos; esta sílica é em grande parte reciclada através da absorção por plantas vivas (ALEXANDRE et al., 1997; STRÖMBERG et al., 2018; WHITE et al., 2012). Assim, é provável que a matéria orgânica acumulada com os resíduos de presas, exsudados e material de descarte do ninho (que pode incluir raízes e outros materiais vegetais removidos durante a escavação) contribui para o aumento deste compartimento lábil de sílica, como demonstrado pelos maiores teores de PASi. Outro resultado que suporta essa interpretação é a corrosão mais marcada de fitólitos no solo dos ninhos, indicativa da intensidade de dissolução química (ALEXANDRE et al., 1997).

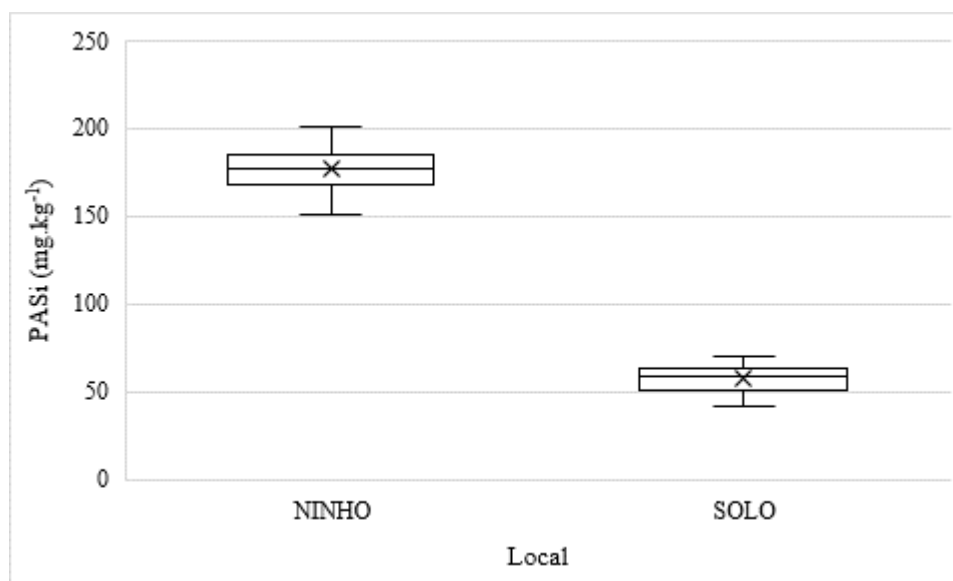


Figura 17. Distribuição dos dados de Silício prontamente disponível para as plantas (PAsi) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = $118,71 \text{ mg.kg}^{-1}$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

O PASi (“*Plant Available Silicon*” ou silício prontamente disponível para as plantas) observado em todos os ninhos está acima dos 130 ppm tidos como valor crítico para a cultura de arroz na Coreia e no Japão (MA; TAKAHASHI, 2002). Há dificuldade em se obter níveis críticos de silício para diferentes culturas por haver pequeno volume de informações científicas e experimentação na área, além dos existentes serem feitos em solos com características muito distintas e os valores de silício serem obtidos com diferentes formas de extração, como o uso do ácido acético (TUBAÑA; HECKMAN, 2015). Os valores aqui apresentados (Figura 17) são

sistematicamente superiores nos ninhos, assim logo após o ninho ser abandonado há acúmulo de silício prontamente disponível, que pode proporcionar uma série de benefícios para as plantas (GUNTZER; KELLER; MEUNIER, 2012; REYNOLDS et al., 2016). Além de trazer benefícios em potencial para as plantas a maior disponibilidade de silício e de carbono podem combinados levar a formação de formas mais estáveis de carbono através da proteção do carbono (redução da exposição a microrganismos e enzimas) pela sílica amorfa e por compostos decorrentes da interação entre silício ferro e silício e alumínio (SONG et al., 2018).

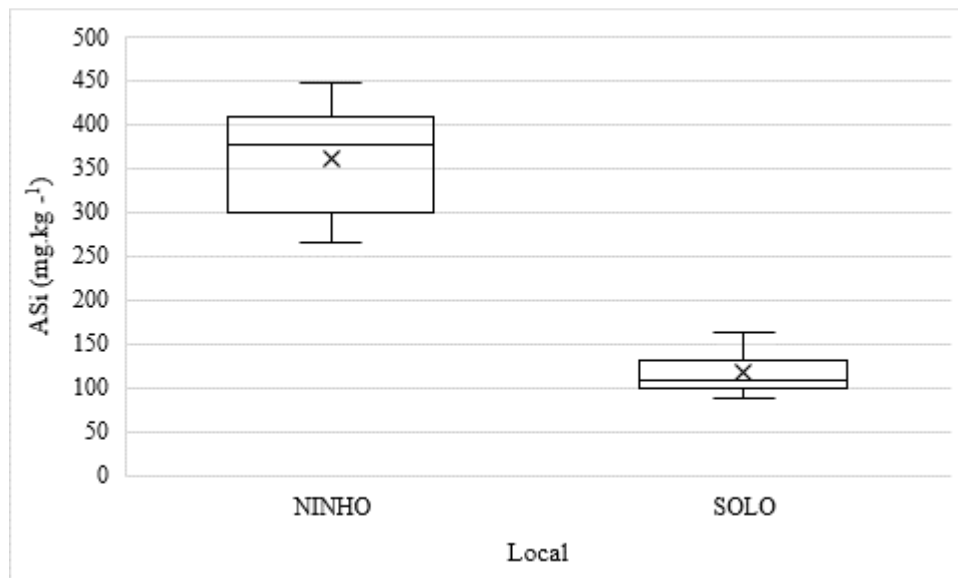


Figura 18. Distribuição dos dados de Silício amorfo (ASi) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = $243,23 \text{ mg.kg}^{-1}$). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

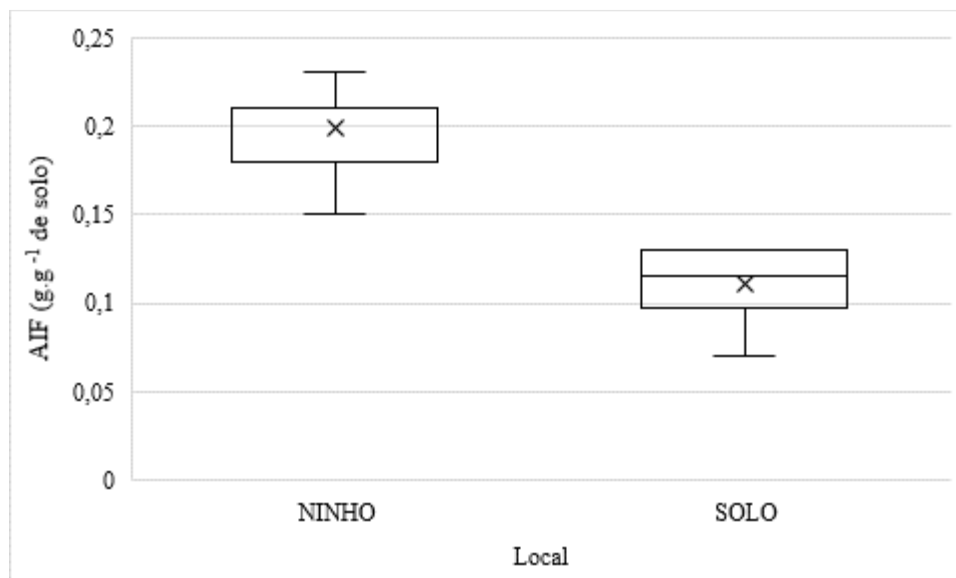


Figura 19. Distribuição dos dados da Fração insolúvel em ácido (AIF) no domo dos ninhos e no solo testemunha ($p < 0,0001$, diferença média = $0,0877 \text{ g.g}^{-1}$ de solo). As barras indicam os valores mínimos e máximos, a linha inferior da caixa indica o primeiro quartil, a linha do meio representa o segundo quartil (mediana) e a linha superior da caixa representa o terceiro quartil, respectivamente os quartis representam 20, 50 e 75% dos valores. O símbolo “x” indica o valor da média.

O incremento de silício biodisponível na forma de ácido silícico (H_4SiO_4) pode ser devido a ação da atividade das formigas de ao menos três formas distintas. A primeira forma através da ação de *Solenopsis* como vetor biológico de nutrientes oriundos de matéria orgânica acumulada com o material de descarte do ninho, que pode incluir além do resíduo de presas, raízes e outros materiais vegetais removidos durante a escavação do ninho e coespecíficos mortos, que ao longo do processo de decomposição poderiam doar íons (H^+) que ao atacar a sílica amorfa (ASi) liberaria o silício biodisponível (Figura 18). O resíduo de presas talvez seja um dos itens mais importantes quando ao se considerar que: (i) foi observada a predação de traça das crucíferas (*Plutella xilostella* L., Lepidoptera:Plutellidae) na forma de larva e de pupa na área experimental da Embrapa Agrobiologia por *Solenopsis invicta* (Adamastor Barros, comunicação pessoal), (ii) larvas de Lepidoptera ao consumir material vegetal aumentam a disponibilidade de diversos elementos como fósforo e potássio (SMITH, 2007), e (iii) a capacidade de acelerar o intemperismo já conhecida para as formigas (DORN, 2014). A possibilidade, em teoria, de interação sinérgica entre a capacidade de folívoros e seus predadores em acelerar o intemperismo deve ainda ser testada experimentalmente. Ainda, poderia se basear na ação de microorganismos do microbioma associado a *Solenopsis* com capacidade de solubilizar minerais silicatados trazidos pelas formigas para o ninho ou mesmo os presentes no solo movimentado (BAHADUR et al., 2019; EHRLICH, 1996).

A segunda forma seria através da obtenção por *S. invicta* de seiva exsudada por insetos sugadores como afídeos e cochonilhas (WU et al., 2013) e posterior deposição via descarte de fezes das formigas no ninho.

Uma terceira forma de atuação como vetor biológico de nutrientes está relacionada a alterações no pH, com origem nos excretas das formigas que além de aminoácidos possuem ácidos graxos como o ácido linoleico, oleico e palmítico (CZACZKES; HEINZE; RUTHER, 2015; VIDKJÆR et al., 2015). O comportamento desses aminoácidos pode originar uma miríade de reações conforme as características definidas pela estrutura das cadeias laterais de cada um, podendo ou não agir como doadores ou receptores de hidrogênio dependendo da

relação entre sua constante de dissociação e o pH do meio (BISCHOFF; SCHLÜTER, 2012). Ao se observar os dados de acidez total estes aminoácidos podem em sua maioria agir mais como tampão, já que há redução na soma $H+Al$ sem se notar diferença de pH entre o material de solo circundante e o solo dos ninhos. Ou seja, hipoteticamente as três formas de aportar silício nos ninhos, que devem ocorrer concomitantemente, poderiam prover ácido silícico o suficiente para ajudar a reduzir a acidez observada na acidez total sem alteração significativa no pH. Um mecanismo com potencial para explicar estas observações seria a reação entre a forma dominante de alumínio em solos ácidos (Al^{+3}) e polímeros de silício que pode levar a formação de aluminossilicatos (JONES; HANDRECK, 1967; WONISCH et al., 2008), consumindo assim o alumínio e reduzindo a acidez total.

Para ter melhor panorama da extensão do impacto destas alterações nos teores de nutrientes deve se levar em conta a dispersão dos ninhos na área de estudo. Em estudo anterior de outros autores no mesmo agroecossistema se observou o valor médio de 74,29 ninhos por hectare, com variação de 13 a 304 ninhos por hectare, dependendo do tipo de cultivo, e com área por hectare variando de $0,45\text{ m}^2\cdot\text{ha}^{-1}$ até $35\text{ m}^2\cdot\text{ha}^{-1}$ (ALMEIDA et al., 2007). Estes ninhos, ou melhor os domos, tendem a ser abandonados, já que esta espécie apresenta o comportamento de deslocamento periódico da colônia com construção de novos domos podendo ainda ser simplesmente abandonados caso a colônia pereça (TSCHINKEL, 1993). Um domo pode permanecer ativo por até 36 meses mas em média duram menos de um ano e geralmente a colônia se desloca para locais próximos de um a 30 metros, sendo que estas mudanças podem ser provocadas por competição com ninhos próximos, presença de patógenos nos domos e por alguma condição química do domo (SHOWLER; KNAUS; REAGAN, 1990). Os territórios que incluem a área usada para forrageamento podem atingir até 121 m^2 e o incremento ou redução da área do território é dependente do número de operárias da colônia (ADAMS, 2003). Ao longo de todo o texto os dados são tratados como sendo de ninhos e de material de solo adjacente, mas talvez seja mais adequado utilizar a terminologia empregada pelo fundador da Zoogeomorfologia que se refere a área do montículo e área intra-montículo (*mound*, *intramound*) uma vez que no tempo geológico, conforme busquei descrever acima, a tendência é que toda a área sofra ou já tenha sofrido em algum período influência dos ninhos (BUTLER, 1995).

A partir dos dados desses estudos e das alterações nos atributos químicos do material de solo dos domos descritas neste capítulo pode ser ter uma ideia de como o agroecossistema pode ser alterado pela ação desta espécie de formiga. Destacando-se que a *Solenopsis invicta* faz parte de uma comunidade que engloba dezenas de outras espécies e diversos outros artrópodes, todos com capacidade de promover bioturbação e de alterar a distribuição e solubilidade do silício, como já descrito para minhocas e cupins que são dois outros importantes bioturbadores (BITYUTSKII; KAIDUN; YAKKONEN, 2016; JOUQUET et al., 2020).

2.8 CONCLUSÕES

Estima-se que as colônias de *Solenopsis invicta* Buren movimentem a cada ano cerca de 200 kg de solo por hectare na área do SIPA e para as coberturas investigadas.

Ao movimentar o solo para construção dos ninhos ocorreu seleção de tamanho de partículas que leva ao aumento da fração correspondente a areia grossa, com redução da fração correspondente a argila total.

As atividades de *S. invicta* levaram ao incremento do carbono orgânico total, do fósforo, do potássio e a redução da acidez total no material de solo dos domos.

O aumento da concentração de silício é maior nos domos dos ninhos e na ordem de cerca de 200 mg.kg⁻¹ de solo para a sílica amorfa e 120 mg.kg⁻¹ no caso do silício biodisponível.

A combinação do aumento dos teores de nutrientes e redução da acidez total acarreta um incremento na saturação de bases do solo dos ninhos.

A atividade de *S. invicta* em especial as relacionadas a alimentação geram acúmulo dos compartimentos (*pools*) de silício incluindo o silício biodisponível. Sendo observada elevação dos valores deste elemento no solo a valores acima do mínimo crítico para culturas como o arroz.

3. CAPÍTULO II

MICROBIOMA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOLENOPSIS

3.1 RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das maiores fontes naturais de entrada de nitrogênio nos ecossistemas e é mediada por bactérias fixadoras de nitrogênio que podem estar associadas a plantas ou outros eucariontes como os insetos. Simbioses de bactérias diazotróficas com insetos já foram descritas para besouros, moscas e cupins. A partir de evidências de literatura foi formulada e testada a hipótese de que bactérias diazotróficas associadas a *S. invicta* poderiam estar realizando a fixação biológica de N. Foram coletadas operárias de 45 ninhos ativos em um agroecossistema sob manejo orgânico no Sistema Integrado de Produção Orgânica – Fazendinha Agroecológica Km 47. Aprisionou-se cerca de 1,62g de operárias vivas em frascos de cromatografia, adicionando-se em seguida acetileno em excesso por 30'. Uma fração da atmosfera foi retirada e injetada em cromatógrafo gasoso. Todas as amostras foram submetidas à análise de redução de acetileno e destas 44 do total apresentaram redução de acetileno a etileno, o que indica atividade de enzimas como a nitrogenase. Destas amostras, 15 foram submetidas a procedimentos de extração de DNA para sequenciamento da região V4 do 16S rRNA para identificação das bactérias associadas as formigas. As 15 amostras apresentam ao menos um gênero bacteriano que possui o aparato gênico para FBN. As sequências de DNA obtidas que abrangem espécies/gêneros com capacidade conhecida de FBN compreenderam cerca 26 % das sequências presentes nas amostras, variando de uma abundância de cerca de 10% no ninho 5 a 51% no ninho 12. A FBN apresentou uma média de 4,3 nmol de N fixado. g (peso úmido).h-1 (n=44). Existem portando indícios da possibilidade de ocorrência de FBN em *S. invicta*. Supõe-se que este seja um holofenótipo importante para o sucesso de *S. invicta* como holobionte invasor e como holobionte hábil em explorar áreas perturbadas. Este é o primeiro estudo indicando a ocorrência de FBN em operárias de formigas e se trata de uma fonte ainda não quantificada nos agroecossistemas e ecossistemas naturais.

Palavras-chave: Metagenômica. Análise de redução de acetileno. Formicidae.

3.2 ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) is one of the largest natural source of nitrogen inputs into ecosystems and is mediated by nitrogen fixing bacteria (NFix) that can be associated with plants or other eukaryotes such as insects. NFix symbiosis with insects has been described for beetles, flies, and termites. Taking into account evidence such as (i) declining colonies of *Solenopsis invicta* Buren when fed in captivity on a protein-rich diet, (ii) reduced nodulation of soybean plants in the presence of *S. invicta* nests and (iii) reports of presence of phylogenetically related bacteria to rhizobia associated with *S. invicta* was formulated and tested the hypothesis that this SI in association with NFix would be able to perform FBN. Workers from 45 active nests were collected in an agro-ecosystem under organic management in the Integrated Organic Production System - Fazendinha Km 47. An average of 1.62 g of live workers was added to chromatography vials that were exposed to acetylene for 30' for the acetylene reduction assay. A fraction of the atmosphere was injected in a gas chromatograph. All samples were submitted to acetylene reduction assay and of these 44 showed a positive result of acetylene reduction and ethylene formation. From these samples, 15 were submitted to DNA extraction procedures for sequencing the V4 region of rRNA 16S to identify bacteria associated with *S. invicta*. The 15 samples have at least one genus with a registered BNF record in the literature. The genera that comprise species with known BNF capacity make up an average of 26.24% of the genera present in the samples, ranging from an abundance of 9.62% in nest 5 to 51.08% in nest 12. BNF presented an average of 4.3 nmol of N fixed. g (wet weight) .h⁻¹ (n = 44). This is supposed to be an important holophenotype for *S. invicta* success as an invading holobiont and as a skilled holobiont in exploring disturbed areas. This is the first study indicating the occurrence of FBN in ant workers and it points out a source not yet quantified of nitrogen in agroecosystems and natural ecosystems.

Keywords: Metagenomics. Acetylene reduction assay. Formicidae.

3.3 INTRODUÇÃO

Os insetos evolutivamente são um grupo de sucesso em ecossistemas terrestres sendo isto atestado pela sua biodiversidade, pela sua biomassa assim como pela miríade de processos que intermediam nos diversos biomas onde estão presentes. Dentre os insetos o maior grupo em biomassa são as formigas. Como estes organismos, em especial as formigas edáficas influenciam os ciclos biogeoquímicos? Como as formigas conseguem a quantidade necessária de nutrientes para estabelecer e manter suas colônias e terem ainda uma grande biomassa? As formigas com maior potencial de ocupar áreas perturbadas e com menos recursos alimentares teriam algum mecanismo extra para obter os nutrientes de que necessitam?

Com estas perguntas em mente e de posse das informações de que o nitrogênio tende a ser um nutriente limitante em muitos ecossistemas e com algumas evidências de que a fixação biológica em insetos é um fato e de que é possível que ocorra em formigas, foram escolhidas as formigas da espécie *Solenopsis invicta* Buren para testar a hipótese deste estudo. Ou seja, de que a fixação biológica de nitrogênio, além de ser teoricamente possível, ocorre de fato em formigas. Sua comprovação, pode ser a chave para entender o sucesso das formigas em colonizar áreas abertas e ter se tornado espécie invasora tão importante na América do Norte.

3.4 REVISÃO DE LITERATURA

Estima-se que o processo de fixação biológica de nitrogênio, intermediado na natureza através de organismos diversos, tenha cerca de 3,2 Ga (STÜEKEN et al., 2015) e até o início do século XIX era a maior fonte de nitrogênio para os ecossistemas, tendo sido superada pelos compostos nitrogenados produzidos industrialmente através do processo Haber-Bosch (MCNEILL; UNKOVICH, 2007; STEIN; KLOTZ, 2016). Apesar de perfazer 78% do ar atmosférico o nitrogênio, presente na constituição de aminoácidos e proteínas, é limitante em diversos ecossistemas naturais e cultivados, não só para os seres autotróficos limitando a produção primária, mas também para os seres heterotróficos (VITOUSEK et al., 2002).

Dentre os organismos heterotróficos, os insetos constituem a maior parte da biomassa animal na maioria dos ecossistemas terrestres. Os valores exatos ainda não conhecidos com precisão, mas mesmo antes que se conheçam estes valores há indícios de que vem se reduzindo de maneira preocupante, em conjunto com a diversidade de insetos que estima-se, representa cerca de três quartos da diversidade animal (ELLWOOD; FOSTER, 2004; HALLMANN et al., 2017). Por se tratar de organismos diminutos podemos nos enganar quanto à relevância dos mesmos, o que desaparece diante das evidências como a de estudo conduzido na Inglaterra que estimou aporte de 3200 toneladas por ano de insetos migratórios oriundos da Europa continental apenas na região sul do país (HU et al., 2016). Outra estimativa útil para se entender a magnitude da influência dos insetos e das formigas vem de revisão recente, onde é estimado que as formigas armazenam 70 megatoneladas de carbono enquanto os demais artrópodes, excluindo os cupins, armazenam 80 megatoneladas de carbono (TUMA; EGGLETON; FAYLE, 2020). As formigas são, portanto, o grupo com maior biomassa dentre os insetos e desempenham diversas funções chave nos ecossistemas (DEL TORO; RIBBONS; PELINI, 2012; FITTKAU; KLINGE, 1973). Mais especificamente sabe-se ainda que as Solenopsis podem estabelecer mais de uma centena de ninhos em apenas um hectare (ALMEIDA et al., 2007) e afetar a distribuição e abundância de outros animais e plantas (PERFECTO, 1994; SEAMAN; MARINO, 2003; STUART; JACKSON; MCCOY, 2003).

Cronologicamente estima-se que a endossimbiose entre microorganismos e insetos se estabeleceu há aproximadamente 300 Ma (MORAN; TELANG, 1998). Estima-se ainda que as primeiras formigas surgiram a cerca de 135 Ma, tornando-se abundantes há cerca de 90 Ma (PERRICHOT et al., 2008; WARD, 2014). A predisposição para a nodulação, por sua vez, tem cerca de 100 Ma (REMIGI et al., 2016). Logo o tempo que as leguminosas amplamente conhecidas pela capacidade de se associarem a bactérias fixadoras de nitrogênio e formarem nódulos em suas raízes, tiveram para estabelecer uma simbiose é teórica e virtualmente o mesmo que tiveram as formigas. Além disto a possibilidade de que estas últimas estejam se beneficiando de maneira similar ao que ocorre em outro reino não possui nenhum impedimento teórico. Ao contrário, pois o paradoxo de Tobin prevê que a grande biomassa de formigas do dossel das florestas tropicais, constituída em sua maioria por formigas que se alimentam de exsudatos florais e de ordenha de insetos sugadores, consumindo alimentos com baixa concentração de aminoácidos e sem os aminoácidos essenciais para a vida dos insetos, as formigas necessitariam de uma fonte destes compostos (DAVIDSON; PATRELL-KIM, 1996; TAMAYO; HEIL, 2015). Esta carência de aminoácidos essenciais poderiam ser supridas em parte por saprofagia, predação e consumo de fezes de pássaros por exemplo, mas outra fonte menos conhecida pode ter sua origem nos microrganismos que habitam o interior das formigas ou seja, o seu microbioma (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020; HU et al., 2017; SUDAKARAN et al., 2017). Insetos como outros seres heterótrofos precisam obter seus nutrientes em suas dietas, dentre os nutrientes o nitrogênio é essencial na síntese proteica e conseguir manter o acesso a este nutriente mesmo em situações em que a fonte de alimento não

apresenta teores suficientes do elemento é uma vantagem adaptativa importante (BERTRAM et al., 2008).

O microbioma pode modular uma série de mudanças no hospedeiro a partir da incorporação de um, ou diversos, organismos inteiros e completamente funcionais com todo seu conjunto de rotas metabólicas (FELDHAAR, 2011). Diferentes funções do microbioma podem incluir desintoxicação, fornecimento de aminoácidos não presentes na dieta, reciclagem de nitrogênio e aparentemente até na participação da produção de precursores de feromônios de trilha (FELDHAAR, 2011; SILVA-JUNIOR et al., 2018).

As formigas de fogo são comuns em agroecossistemas, possuem importância como controle natural de insetos praga e apresentam potencial de se tornar espécies invasoras (EUBANKS, 2001; STUART; JACKSON; MCCOY, 2003). No Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) já foi registrada uma densidade de cerca de 74 ninhos de *Solenopsis invicta* por hectare (ALMEIDA et al., 2007). Apesar de ser abundante em agroecossistemas tropicais o fato de ter se tornado uma espécie invasora criou o interesse em se conhecer o microbioma destes organismos e os artigos já publicados refletem parte do microbioma de alguns ninhos e indivíduos coletados nos Estados Unidos, mais especificamente no Texas (ISHAK et al., 2011b; POWELL; HANSON; BEXTINE, 2014) e no Missisipi (WOOLFOLK et al., 2016).

As formigas podem influenciar na modulação da comunidade microbiana da mirmecosfera e na dispersão de micro-organismos tanto em decorrência de seu deslocamento quanto nas mudanças provocadas em decorrência da escavação, manutenção e atividades usuais transcorridas no ninho (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020). Os microrganismos que vivem intimamente relacionados às formigas influenciam no seu sucesso em sobreviver a agentes entomopatogênicos e podem até mesmo serem indispensáveis para a vida da colônia (HAEDER et al., 2009; ISHAK et al., 2011a; PINTO-TOMÁS et al., 2009b; SEN et al., 2009). Evidências sugerem que rainhas fundadoras de *S. invicta* possuem a capacidade de selecionar locais de nidificação baseados em moléculas emitidas por bactérias capazes de controlar fungos entomopatogênicos, reduzindo assim o risco de contágio de doenças, aumentando não só sua própria chance de sobrevivência como a chances de obter sucesso na fundação da nova colônia (HUANG et al., 2020). As formigas são reconhecidamente capazes de dispersar agentes patogênicos em hospitais ou fitopatógenos em culturas agrícolas, mas até recentemente não se encontrava na literatura relatos ou se cogitava a possibilidade de dispersão de micro-organismos promotores de crescimento, como por exemplo, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020; EL-HAMALAWI; MENGE, 1996; FOWLER et al., 1993) excetuando-se talvez apenas o elegante e centenário estudo conduzido por Amedeo Berlese (GIGLIOLI, 1897).

As infecções por bactérias e fungos podem ocorrer externamente estando ou não limitadas ao tegumento ou serem internas estando dispersa na hemolinfa ou em estruturas especializadas (BORM et al., 2008; SUDAKARAN et al., 2017). A relação entre formigas e a microbiota do solo já é conhecida desde o final do século XVIII onde ficou demonstrada, em ambiente estéril, a capacidade das formigas em inocular leveduras obtidas no solo de vinhedos e assim permitir o início da fermentação de cachos de uva (GIGLIOLI, 1897).

A primeira endossimbiose descrita em insetos foi feita para uma formiga do gênero *Camponotus* e desde este artigo seminal muito tem se avançado neste campo, principalmente com o uso de técnicas de biologia molecular (SCHRÖDER et al., 1996). Há na literatura registros obtidos através da amplificação de regiões do DNA ribossômico de bactérias presentes tanto nos ninhos de formigas (BOOTS; CLIPSON, 2013; HAEDER et al., 2009; JOHANSSON et al., 2013; KELLNER et al., 2015; REYES; CAFARO, 2015) como na qualidade de endossimbiontes (ANDERSON et al., 2012; BORM et al., 2008; HU et al., 2018b; ISHAK et al., 2011b; RUSSELL et al., 2009). Alguns destes endossimbiontes foram descritos habitando

órgãos internos de formigas dos gêneros *Tetraponera*, *Cephalotes* e *Acromyrmex* tendo sido caracterizados como bactérias filogeneticamente relacionadas a bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* (ANDERSON et al., 2012; BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020; BORM et al., 2008). Em alguns casos foram descritas estruturas para que essas bactérias se alojem não sendo descartadas a possibilidade de que o nitrogênio do ar esteja sendo fixado no interior de seus corpos e liberado via excreção (ANDERSON et al., 2012; BORM et al., 2008; HU et al., 2014; SAPOUNTZIS et al., 2015). Diante desse acúmulo de informações sobre a microbiota bacteriana de diversas espécies de formiga é factível se esperar que algumas das formigas que nidificam no solo possam estar se beneficiando de endossimbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e assim estarem contribuindo para entrada de nitrogênio via fixação biológica, algo já conhecido para diversos grupos de insetos (TAMAYO; HEIL, 2015).

A fixação biológica de nitrogênio em artrópodes pode ser fenômeno comum e mais relevante do que se poderia esperar, já tendo sido demonstrada em cupins, besouros e mosca das frutas (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020; BEHAR; YUVAL; JURKEVITCH, 2005; MORALES-JIMÉNEZ et al., 2009; TÄYASU et al., 1994). Estima-se que a fixação de nitrogênio nos organismos dos artrópodes represente algo em torno de 10 a 40 kg/ha/ano e portanto representaria contribuição significativa para o balanço de nitrogênio em alguns ecossistemas (NARDI; MACKIE; DAWSON, 2002; TAMAYO; HEIL, 2015).

Apesar de existirem estudos recentes demonstrando a ocorrência de bactérias filogeneticamente relacionadas a bactérias fixadoras de nitrogênio no trato digestivo de diversas formigas, via de regra os autores que descrevem estes microbiomas em sua maioria não sugerem a possibilidade da ocorrência de FBN nestes organismos (BORM et al., 2008; HU et al., 2014). Diante desta possibilidade e do conhecimento acumulado até o presente momento se conhece apenas a ocorrência de fixação biológica de nitrogênio de forma não endossimbiótica nos jardins de fungo de saúva (PINTO-TOMÁS et al., 2009b). Apesar da importância da fixação biológica de nitrogênio, a associação entre formigas e bactérias vai além, no caso da associação entre formigas e *Burkholderia* sp. que além de uma provável fixação de nitrogênio – ainda não especulada nem comprovada - pode conferir uma ação antibiótica contra fungos entomopatogênicos comuns nos locais de nidificação (ANDERSON et al., 2012).

Como dito anteriormente já foi confirmada a ocorrência da FBN com o uso de técnicas de redução de acetileno e abundância natural de δN_{15} tanto com cupins como em formigas (PINTO-TOMÁS et al., 2009b; TÄYASU et al., 1994). Não obstante a maioria dos trabalhos se baseia na identificação dos microrganismos através de técnicas de biologia molecular e não se aprofundam a ponto de supor a ocorrência de FBN ou confirmar se os genes *nif* estão sendo expressos (ISHAK et al., 2011b; KAUTZ et al., 2013; SAPOUNTZIS et al., 2015). Quanto a este último fator citado, há que se destacar que se cogita a possibilidade de ocorrência de FBN sem expressão de genes *nif* (HIGDON et al., 2020).

Uma forma prática de verificar a fixação biológica de nitrogênio é a análise da redução de acetileno (ARA) que consiste em oferecer o acetileno como substrato para a enzima nitrogenase, que é a enzima responsável pela quebra da tripla ligação do N_2 , e que por apresentar afinidade ao acetileno, o reduz produzindo etileno, sendo esta uma técnica de uso amplo desde a década de 1960 (DILWORTH, 1966; HARDY et al., 1968; STAAL et al., 2001). É uma metodologia relativamente simples e de custo reduzido mas possui limitações e alguns protocolos que devem ser ajustados como toda metodologia (DE BONT; MULDER, 1976; MINCHIN et al., 1983; MINCHIN; SHEEHY; WITTY, 1986). Apesar do aumento no uso de técnicas de metagenômica a ARA ainda é de grande utilidade e continua a ser empregada como técnica complementar (HOFFMAN et al., 2014; PINTO-TOMÁS et al., 2009a, 2009b; SPATZAL et al., 2014). Dentre as pesquisas visando determinar a ocorrência de fixação biológica de nitrogênio em insetos algumas utilizaram este método (PINTO-TOMÁS et al.,

2009b; TÄYASU et al., 1994). Apesar de existirem estudos sobre o microbioma de formigas de fogo (*Solenopsis* sp) (ISHAK et al., 2011b) não foram encontrados registros na literatura utilizando ARA em indivíduos de *Solenopsis*, de fato foram encontrados apenas dois artigos sobre ARA em formigas, tendo sido analisados indivíduos do gênero *Atta* (PINTO-TOMÁS et al., 2009b) e do gênero *Cephalotes* (HU et al., 2018b) não havendo sinal de redução nos indivíduos analisados em ambos os casos.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Área de coleta

A área de coleta situa-se no Sistema Integrado de Produção Agroecológica – SIPA (Fazendinha Agroecológica km 47), localizado em Seropédica, RJ (latitude 22° 45' S, longitude 43° 41' N e altitude que varia entre 30 e 70 m), numa região da Baixada Fluminense de relevo levemente ondulado e com solos classificados como ARGISSOLOS e PLANOSSOLOS (NEVES et al., 2005, SANTOS et al., 1999). As coletas das operárias nos ninhos foram realizadas em uma área de 4,6 hectares inserida no SIPA conforme consta na descrição feita no Capítulo I desta tese.

3.5.2 Coleta e acondicionamento dos indivíduos e exposição ao acetileno

Este primeiro passo trata da coleta de operárias vivas de formigas de fogo e seu acondicionamento em frascos de cromatografia de maneira eficiente. As primeiras coletas para as análises piloto foram feitas com pinça, indivíduo por indivíduo após a perturbação do ninho. O volume coletado após cerca de uma hora de esforço não atingia um terço das quantidades utilizadas após o aperfeiçoamento da coleta. Posteriormente foi tentado o método de “drip” que se baseia em flotar as formigas, porém tal método se mostrou inefetivo pois produzia uma mistura de detritos, talco industrial e operárias (MCDONALD, 2012).

O método final adotado consiste no uso de equipamentos rudimentares e de baixo custo e se baseia no método utilizado para estudos de controle biológico da formiga de fogo (COMPTON, 2016). Foi utilizado cano de PVC de 1 polegada com 75cm de comprimento com uma das pontas tampadas, o qual, ao ser colocado em contato com o formigueiro perturbado mecanicamente recebe as operárias e soldados que reagem à perturbação (Figura 20).



Figura 20. Bastão de PVC sendo usado para coletar as operárias após perturbação mecânica do ninho.

Uma vez que estas enxameiam a haste, a mesma é batida sobre a borda de uma bandeja plástica previamente tratada nas bordas com talco industrial para prevenir a fuga dos organismos, para que se desprendam do bastão e então são transferidas para recipientes de 2L também isolados com talco industrial e devidamente identificados com o número da amostra

(Figura 21). O talco foi aplicado com parcimônia com auxílio de um algodão evitando que este se espalhasse pelo recipiente.



Figura 21. Recipiente de contenção da amostra logo após a coleta com as operárias utilizadas para as análises de redução de acetileno e metagenômica. A fuga das operárias é impedida pela ação do talco industrial aplicado na borda do recipiente.

Após esta operação as formigas foram transferidas para um recipiente plástico de 2 litros e mantidas em ambiente fresco e protegido do sol. Todas as coletas foram realizadas durante o período da manhã.

O período da tarde foi reservado para a transferência dos indivíduos para os frascos de vidro para cromatografia gasosa de 10ml (*vial*). Para tal foi utilizada uma bandeja também isolada com talco industrial onde se colocava no centro o vial. Rapidamente com o uso de pinças entomológicas é feita a transferência da massa de formigas para dentro do vial que com movimentos delicados de pinça tendem a formar um cacho facilitando o acondicionamento no mesmo. Em seguida o frasco é fechado com tampa metálica provida de septo ainda sem efetuar o lacre. Uma vez que o CO₂ pode interferir na análise de redução de acetileno, o lacre propriamente dito foi feito para todas as amostras após a última das amostras ser colocada no vial para evitar o acúmulo de CO₂ nos recipientes, somente então com auxílio de alicate para fixação manual de lacres tipo crimp (Thermo) os vials eram efetivamente fechados. A transferência de cada grupo de cerca de 2 a 3 gramas de operárias levou em média 5 minutos por amostra.

3.5.3 Análise de redução de acetileno

Foram conduzidos ensaios de redução de acetileno em operárias coletadas em ninhos de *Solenopsis invicta* sendo confirmado posteriormente a identificação das espécies construtoras com uso de chave taxonômica (PACHECO; MACKAY, 2013). O teste de redução de acetileno teve como ponto de partida os protocolos utilizados para cupins (BENEMANN, 1973) e para operárias de formiga (PINTO-TOMÁS et al., 2009b, 2009a). O sistema empregado é similar ao de coleta de gases ambientais para cromatografia. Foram retirados cerca de 10% da atmosfera e injetados o mesmo volume de gás acetileno, obtido através da reação de liberação por reação de carbureto de cálcio e água. Após 30 minutos de exposição das formigas ao acetileno foi

coletada a atmosfera como seringas equipadas com válvulas e transferida a atmosfera para vials com vácuo e fechados como descrito anteriormente (Figura 22). Após o término da exposição das operárias foram coletados 0,5 mL da atmosfera acetilênica através de uma seringa gas-tight (Hamilton) e injetados em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC2010 Plus munido de detector de ionização de chama (FID). As condições cromatográficas foram o emprego de coluna cromatográfica Porapak® 80-100 A° com 0,80 m de extensão, fluxo do gás de arraste de 30 mL por min, temperatura isotérmica de 60°C com tempo de corrida de 3 minutos. A curva de calibração continha 5 níveis de concentração realizadas em triplicata abrangendo concentrações obtidas na análise das amostras apresentadas.

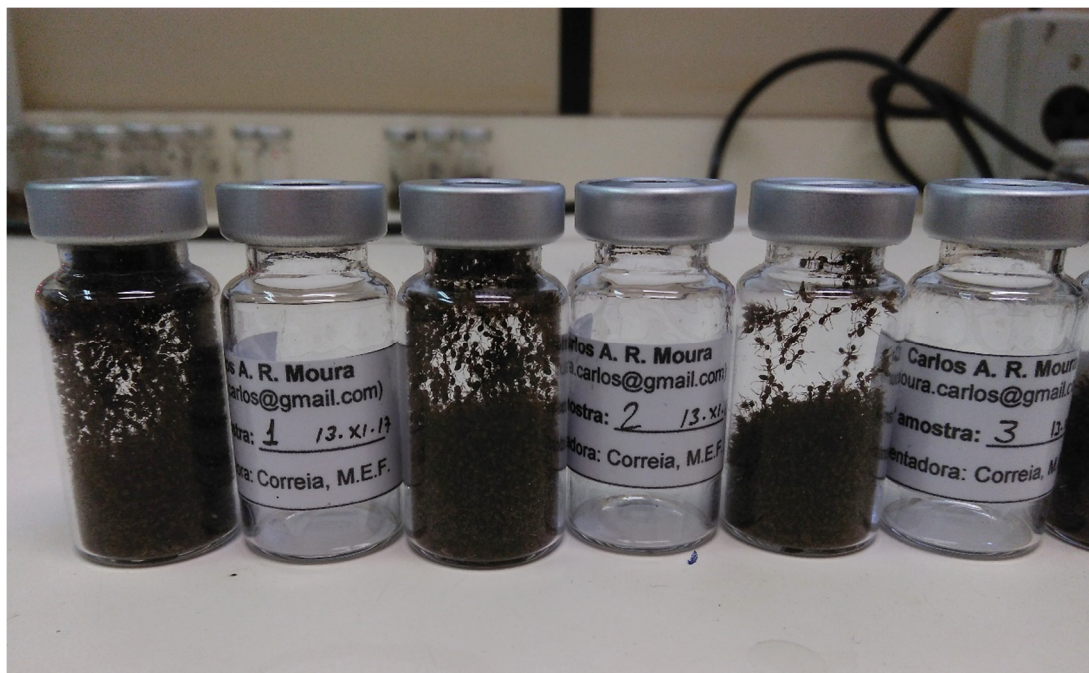


Figura 22. Vials com as formigas após a exposição ao acetileno e os respectivos vials com a atmosfera retirada após a exposição ao acetileno. Imagem da primeira coleta com 30 amostras realizada em novembro de 2017. Em todas as amostras as formigas permaneceram vivas após o término da exposição ao acetileno.

O tempo de 30 minutos foi definido empiricamente por ocasião dos testes preliminares pois em 15 minutos o sinal de redução (etileno produzido) era fraco ou inexistente e em 1 hora não havia incremento na produção de etileno em relação ao tempo de 30 minutos. Há, portanto, a necessidade do acetileno se difundir no corpo das formigas para que as bactérias que compõem o microbioma das formigas tenham acesso a este gás, havendo a possibilidade de redução a etileno pela ação da nitrogenase. Ao mesmo tempo deve se ter em mente o fato de que a anaerobiose também reduz a eficiência da nitrogenase e as formigas devem permanecer vivas durante a exposição (BENEMANN, 1973).

Além de se obter a atmosfera dos frascos com formigas expostas ao acetileno para fins de controle foram usados frascos: i) somente com ar atmosférico, ii) somente com acetileno e iii) com operárias sem exposição ao acetileno.

Todas as formigas foram pesadas em balança de precisão no laboratório de Fauna do Solo da Embrapa Agrobiologia para a obtenção de dados de fixação de nitrogênio por grama, sendo feita a opção por se utilizar o peso úmido.

Para os cálculos se admitiu relação 3:1 decorrente da afinidade da enzima nitrogenase em relação ao acetileno e ao nitrogênio elementar como utilizado por outros autores (CURTIS; WALLER, 1996; PRESTWICH; BENTLEY; CARPENTER, 1980). Deve-se levar em conta

porém, que esta relação é teórica e pode sofrer variações (SAIZ et al., 2019), já que se trata de um estudo pioneiro para formigas, tomou-se como referencial estudos semelhantes feitos com outros insetos, a fim de se obter dados interpretáveis.

3.5.4 Microbioma de *Solenopsis invicta*

Após verificar a ocorrência da redução de acetileno nas amostras foram iniciados os procedimentos para a extração de DNA para a identificação das variantes de sequências amplificadas (Amplified Variation Sequence, ASV) por meio de metagenômica baseada na região do 16S rRNA. Do conjunto de operárias obtidas em cada ninho foi reservada uma amostra com cerca de 20 a 30 formigas conservadas em álcool 70% e congeladas, das quais cinco operárias de cada amostra foram utilizadas para a extração de material para análises de metagenômica.

A primeira coleta foi realizada nos dias 13/11, 14/11 e 23/11/2017 totalizando 30 amostras. As formigas coletadas primariamente para as análises de redução de acetileno tiveram todas as operárias coletadas expostas ao acetileno e depois conservadas em freezer sem líquido conservante. Destas amostras foi retirada uma fração das operárias para a extração de DNA. Por motivo desconhecido em sua maioria não foi possível extrair DNA com quantidade e qualidade suficiente.

Diante da dificuldade de se obter quantidade significativa de DNA das primeiras amostras foram coletadas 15 novas amostras em 6/05/2019. Nestas novas amostras foram repetidos ensaios de redução de acetileno, porém visando garantir a obtenção de material para estudos de metagenômica se separou uma fração das formigas coletadas apenas para fins de extração de DNA. Nestas amostras compostas por cerca de 30 operárias de cada um dos 15 ninhos, os indivíduos não foram expostos ao acetileno sendo a conservação feita em álcool 70% com as amostras mantidas em freezer. Destas amostras foram obtidas quantidades de DNA adequadas, sendo assim possível realizar a amplificação da região 16S rRNA das 15 amostras coletadas. As tentativas de amplificar o gene *nifH* não apresentaram resultados satisfatórios.

Os protocolos de obtenção do DNA tiveram como base os mesmos utilizados por (GADAU, 2009) e por (RUBIN et al., 2014), consistindo no kit de extração de DNA DNeasy PowerSoil da Quiagen. As quantidades necessárias de DNA foram obtidas após algumas adaptações. No primeiro passo as amostras, que consistiam em cerca de 5 formigas de cada ninho, foram resfriadas em nitrogênio líquido e piladas com pistilo virgem, sendo em seguida adicionados os reagentes do primeiro passo (C1, 60µL), agitados nos microtubos power beads (micro-esferas para auxiliar no rompimento celular) que acompanham o kit de extração e acrescentando proteinase K (5 µL). Depois deste último passo, as amostras foram mantidas em banho maria overnight a 56°C, antes de iniciar os procedimentos seguintes, sendo agitadas no FastPrep® por 40s na velocidade 5,5. Os passos seguintes foram de acordo com o protocolo do kit de extração.

O gene RNAr 16S foi sequenciado na plataforma MiSeq, com a metodologia pair-end. Os primers utilizados foram OS X e Y desenhados para amplificar a região V4 do RNAr 16S de procariotos. O sequenciamento foi realizado na empresa MacroGen, Inc.. As sequências foram analisadas utilizando-se a metodologia de ASVs implementada no pacote DADA2 1.16 para a plataforma R (CALLAHAN et al., 2016). A qualidade das sequências foi inspecionada, procurando-se manter escore de qualidade mínimo de 30. As regiões de baixa qualidade foram excluídas. Posteriormente, as taxas de erro foram determinadas e utilizadas para eliminação de sequências de baixa qualidade, inferência das ASVs e junção das fitas líder e complementar da região amplificada. As potenciais quimeras foram removidas e a taxonomia dos organismos foi realizada com o método classificador ingênuo de Bayes (naïve Bayesian Classifier)

desenvolvido pelo Ribosomal Database Project (COLE et al., 2014) e utilizando-se a base de dados de sequências Silva versão 132 (QUAST et al., 2013).

A tabela de ASVs foi utilizada para análises estatísticas com o pacote phyloseq, também implementado na plataforma R (MCMURDIE; HOLMES, 2013). As análises dos dados de abundância das ASVs obtidas foram analisadas no ambiente R com os pacotes VEGAN (DIXON, 2003) e com os pacotes básicos do ambiente R. A abordagem de ASVs é uma abordagem mais moderna permitindo maior economia computacional em relação à abordagem de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), além de incrementar a precisão nas identificações com um maior controle de erros e maior resolução do que se observa ao se utilizar métodos baseados em métodos de rotulagem consistente (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017).

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comunidade microbiana associada às operárias de *Solenopsis invicta* existentes no SIPA é dominada por bactérias do gênero *Wolbachia* que foi o gênero mais abundante em 8 das 15 amostras sequenciadas com uma quantidade de ASVs em muito superior ao dos outros gêneros (Figura 23).

No nível taxonômico de gênero temos bactérias já reconhecidas em outras situações seja em vida livre ou em simbiose como fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras de crescimento (Figuras 23 e 24). Além disso temos gêneros que abrigam bactérias patogênicas para humanos, bactérias fitopatogênicas e três gêneros ao menos com bactérias com registros na literatura de informações relacionadas a biologia de formigas. Destes, temos *Wolbachia* gênero dominante em todas as amostras que é conhecido por regular os processos de reprodução de diversas espécies de insetos. Temos ainda em menor frequência *Xenorhabdus* um gênero frequentemente associado a nematóides entomopatogênicos de solo e o gênero *Amycolatopsis* com capacidade de conferir proteção contra fungos como será descrito a seguir.

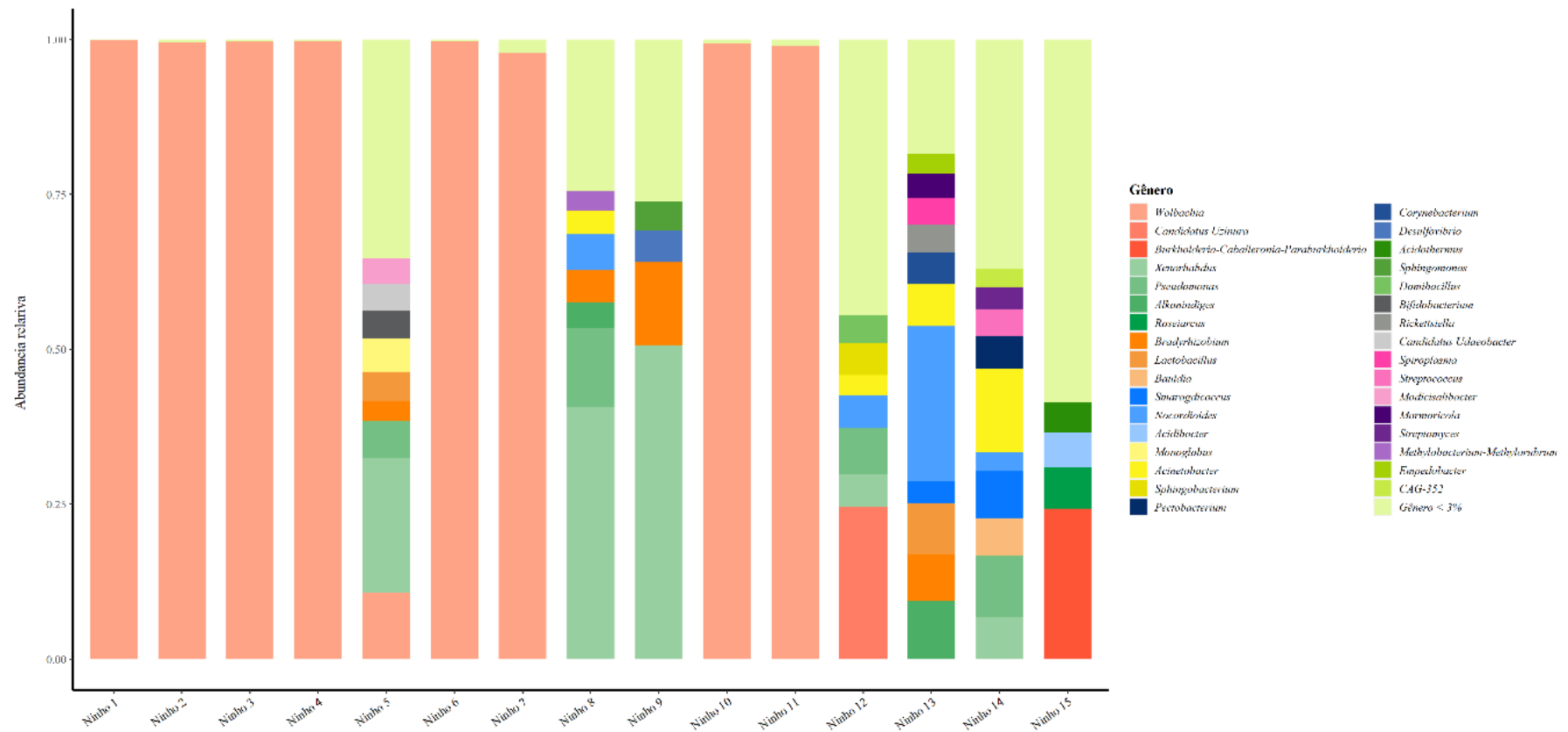


Figura 23. Abundância relativa dos Gêneros por amostras de formigas da espécie *S. invicta* de 15 diferentes ninhos (n=15). Para fins de visualização apenas estão representados apenas gêneros com abundância maior que 7%. O filtro de abundância para as análises foi de 3%.

Várias das bactérias detectadas, que possuem informação escassa sobre sua biologia ou com biologia não associada às outras classes aqui apresentadas, são apresentadas na listagem a seguir como outras, algumas das bactérias podem estar em mais de um grupo sendo ao mesmo tempo por exemplo fitopatogênicas e promotoras de crescimento. Diante de consulta a literatura se separou preliminarmente os gêneros nos grupos abaixo, o número entre colchetes indica a presença em relação ao número de amostras analisadas neste estudo:

- Fixadoras de nitrogênio: *Burkholderia* [1/15](MANNAA; PARK; SEO, 2018), *Bacillus* [2/15](RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD ALLAH, 2017), *Bradyrhizobium* [6/15](DELAMUTA et al., 2016), *Sphingomonas* [5/15](ASAF et al., 2020), *Acinetobacter* [7/15] (CHAUDHARY et al., 2012; KUAN et al., 2016), *Methylobacterium* [8/15] (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2018), *Pseudomonas* [5/15](FOX et al., 2016b), *Streptomyces* [5/10](DAHAL et al., 2017), *Azospirillum* [1/15] (FUKAMI; CEREZINI; HUNGRIA, 2018), *Brevudimonas* [2/15] (NAQQASH et al., 2020), *Serratia* [1/15] (LI et al., 2022), *Stenotrophomonas* [1/15] (HUDA et al., 2022; SINGH; JHA, 2017), *Mycobacterium* [8/15] (GTARI et al., 2012).
- Promotoras de crescimento (PGPR): *Acidovorax* [1/15] (LI et al., 2012), *Chitinophaga* [3/15] (ZHANG et al., 2019), *Ramlibacter* [2/15](SKOURI-PANET et al., 2018), *Gordonia* [1/15] (KAYASTH; KUMAR; GERA, 2014), *Stenotrophomonas* [2/15] (RAMOS et al., 2011; SINGH; JHA, 2017), *Luteolibacter* [2/15] (ZADEL et al., 2020), *Chryseobacterium* [4/15] (DARDANELLI et al., 2010), *Comamonas* [2/15] (SHARMA et al., 2017), *Corynebacterium* [6/15] (MAHESHWARI; DHEEMAN; AGARWAL, 2015), *Staphylococcus* [6/15] (AKRAM et al., 2016), *Curtobacterium* [4/15] (VIMAL; PATEL; SINGH, 2019), *Massilia* [4/15] (ZHANG et al., 2020), *Arthrobacter* [4/15] (CHHETRI et al., 2022), *Solirubrobacter* [2/15] (LEÓN et al., 2017).
- Com potencial de patogenicidade em humanos: *Elizabethkingia* [1/15] (LAU et al., 2016), *Neisseria* [1/15] (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020; QUILLIN; SEIFERT, 2018), *Salmonella* [2/15] (GAST; PORTER, 2020), *Staphylococcus* (POLLITT et al., 2018), *Bacillus anthracis* [2/15] (HUGH-JONES; BLACKBURN, 2009).
- Potencial de patogenicidade em plantas: *Acidovorax* (BURDMAN; WALCOTT, 2018), *Curtobacterium* (SOARES et al., 2018).
- Simbionte de nematoides entomopatogênicos de solo e tida como repelente para formigas: *Xenorhabdus* [8/15] (GULCU; RAJA; HAZIR, 2017).
- Simbionte de nematóides com capacidade conhecida de matar lesmas: *Moraxella osloensis* [13/15] (BÖVRE; HENRIKSEN, 1967).
- Produtor de rifamicina B e já relatado como promotor de ação antifúngica em ninho de formigas cultivadoras de fungo (Attini) protegendo o jardim de fungos: *Amycolatopsis* [6/15] (SEN et al., 2009).
- Outras: *Akkermansia* [1/15] – comum no microbioma do intestino humano (CANI; DE VOS, 2017), *Cystobacter* [1/15] – fonte de antibióticos (SCHÄBERLE et al., 2014), *Geobacillus* [7/15] – termofílico, produção de celulase e xilanase (BIBRA; KUNREDDY; SANI, 2018; POTPROMMANEE et al., 2017), *Marmoricola* [6/15] – comum em solos com presença de sódio e manguezais (JIANG et al., 2018), *Smaragdicoccus* [8/15] – carece de

informações além de sua taxonomia, a espécie tipo foi descrita em 2007 (KASAI, 2015) e *Noviherbaspirillum* [4/15] para o qual a literatura ainda é rara (DAUSSIN et al., 2023).

Chama a atenção a presença de *Stenotrophomonas maltophilia* em duas amostras, esta bactéria é tida como um dos simbiossiontes responsáveis pela fixação de nitrogênio em larvas de besouros da espécie *Dendroctonus valens* e o faz através do *nifD* e não do *nifH* (MORALES-JIMÉNEZ et al., 2009). Neste artigo os autores não encontraram *in vitro* nem o *nifD* nem o *nifH*, sendo o *nifD* detectado apenas na metagenômica feita com o DNA extraído do estômago dos insetos estudados. No meu estudo foram usados organismos inteiros e somente se tentou amplificar o *nifH* sem que o mesmo tenha sido detectado.

Todas as amostras possuem ao menos um gênero com registros de fixação biológica descritas conhecida para alguma espécie com ocorrendo com abundância relativa superior a 3% sendo usado o valor de 7% apenas para fins de visualização dos dados. Em suma, para os gêneros com ao menos uma espécie com capacidade de promoção de crescimento de plantas (PGPR) seja por solubilização de minerais, imobilização de metais, produção de hormônios dentre outros (CHAPARRO et al., 2012) e os gêneros que abrigam espécies com capacidade conhecida de fixação de nitrogênio os mesmos estão representados em todas as amostras.

Apesar de ter seus dados incluídos na discussão da abundância de Filo, Família e Gêneros de bactérias o ninho 8 (amostra 8) foi eliminado das análises e não faz parte da discussão a seguir pois a injeção da amostra no FID foi perdida.

Quanto aos dados da análise de redução de acetileno se observou que os frascos sem acetileno, assim como os frascos com formiga sem adição de acetileno e os frascos que continham apenas ar atmosférico não apresentaram sinal de etileno. Os frascos com formigas vivas expostas ao acetileno invariavelmente apresentaram sinal de redução de acetileno. Ou seja, os frascos com formigas expostas ao acetileno apresentaram picos de produção de etileno claramente distintos dos frascos testemunha com acetileno e sem operárias. Excluindo os estudos preliminares foram analisadas 45 amostras no total, um grupo com 30 amostras para as quais não se conseguiu quantidade suficiente de DNA para prosseguir com as análises de metagenômica e um outro grupo com 15 amostras de onde foi possível obter uma quantidade suficiente de DNA para realizar a identificação dos microorganismos, nesta segunda coleta foi perdida a amostra do ninho 8 sendo portando consideradas apenas 44 amostras (Figuras 25 e 26). Destas a produção de etileno variou de de 1 nmol de C₂H₄.h-1 a 45 nmol de C₂H₄.h-1 com uma média de 23 nmol de C₂H₄.h-1. A fixação de nitrogênio variou de 0,08 a 32,33 nmol de N fixado. g (peso úmido).h-1 com uma média de 4,3 nmol de N fixado. g (peso úmido).h-1 e o peso úmido dos grupos de formigas expostas ao acetileno obtido após a exposição ao acetileno variou de 0,25g a 3,88g com uma média de 1,62g.

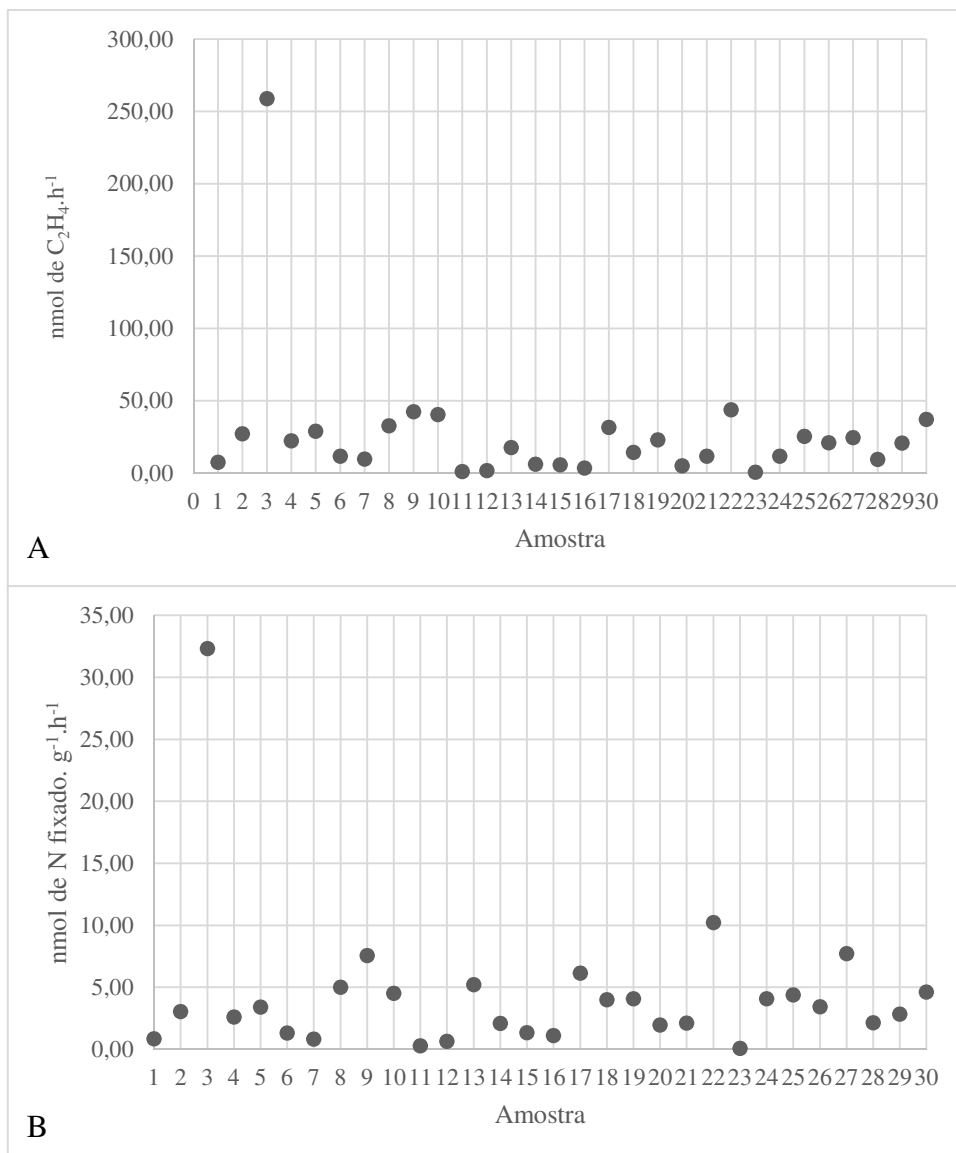


Figura 25. Gráficos dos resultados da ARA do primeiro conjunto de amostras de formigas da espécie *Solenopsis invicta* de 30 diferentes ninhos ARA (n=30). A: conjunto de dados em nmol de $C_2H_4 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$; B: conjunto de dados em nmol de N fixado. $g^{-1}(\text{peso úmido}) \cdot h^{-1}$ utilizando um fator de conversão de 3:1.

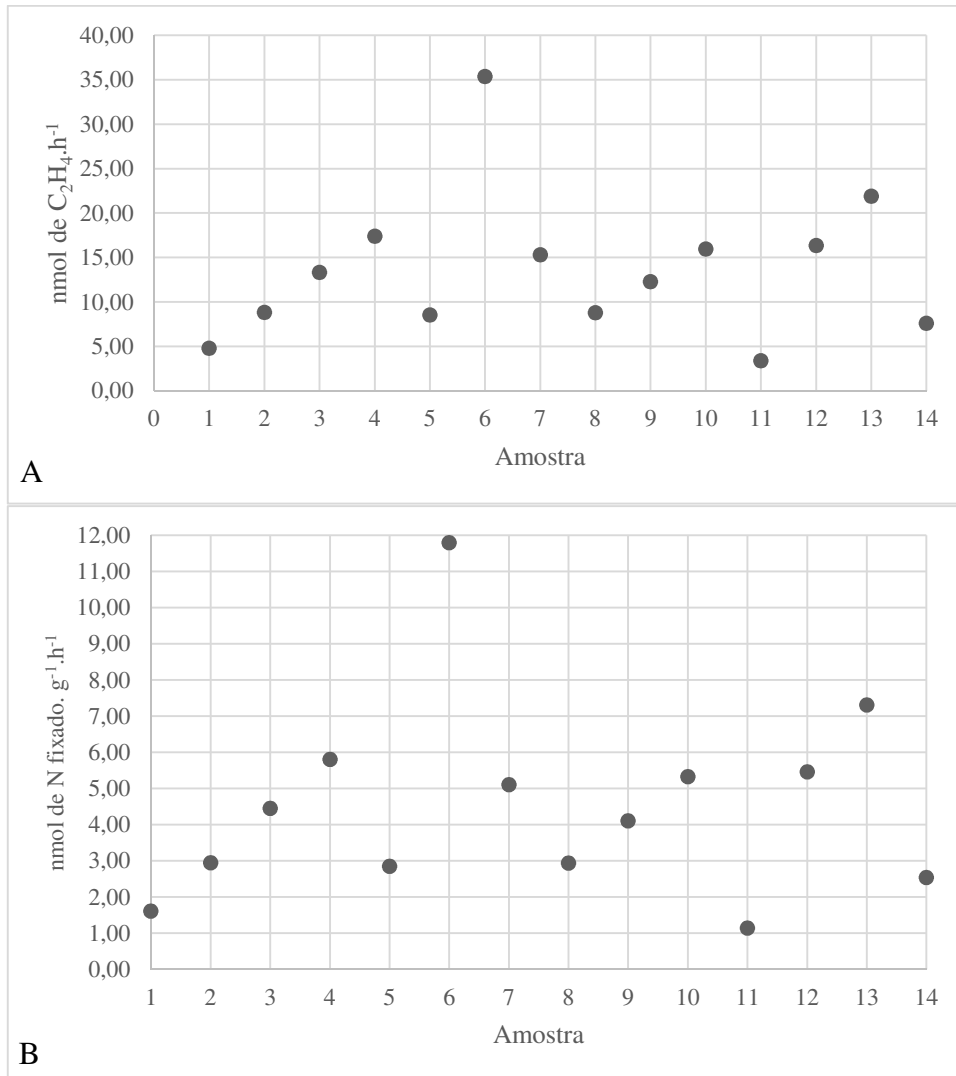


Figura 26. Gráficos dos resultados da ARA do segundo conjunto de amostras de formigas da espécie *Solenopsis invicta* de 15 diferentes ninhos ARA (n=14). A: conjunto de dados em nmol de $C_2H_4.g^{-1}.h^{-1}$; B: conjunto de dados em nmol de N fixado. $g^{-1}.h^{-1}$ utilizando um fator de conversão de 3:1.

3.7 CONCLUSÕES

Operárias de *Solenopsis invicta* Buren coletadas no SIPA possuem bactérias com potencial de fixação de nitrogênio associadas.

Há ainda associação como bactérias promotoras de crescimento (PGPR).

Amostras de *S. invicta* vivas apresentam redução de acetileno a etileno, sendo este um indicativo da atividade da enzima nitrogenase.

Não foi possível amplificar genes *nifH* sendo sugerido que em estudos futuros se faça a busca por *nifD* e *nifK*.

Há correlação entre presença de sequências representativas de ASVs relacionadas a bactérias fixadoras de N e a redução de acetileno, sendo este um indicativo de atividade de ocorrência de FBN.

4. CAPÍTULO III

PLANTAS ATRATIVAS E A COMUNIDADE DE FORMIGAS EDÁFICAS

4.1 RESUMO

Em uma perspectiva de manejo sustentável de agroecossistemas umas das estratégias de se implementar o controle biológico conservativo passa pelo uso de cultivos de plantas atrativas, capazes de fornecer recursos alimentares e refúgio aos inimigos naturais. Para verificar a efetividade do método e a atração da comunidade de formigas se registrou a atividade de artrópodes terrestres em uma área de Planossolo durante seis meses, de junho a dezembro de 2017, em experimento envolvendo plantas atrativas, no campo experimental da Embrapa Agrobiologia na cidade de Seropédica, RJ, Brasil. As plantas atrativas incluíam *Crotalaria spectabilis* Röth., *Canavalia ensiformis* (L.) DC., *Cosmos sulphureus* Cav., *Foeniculum vulgare* Mill. e vegetação espontânea. A captura dos artrópodes foi realizada com armadilhas pitfall deixadas no campo por sete dias. Vários grupos de artrópodes foram coletados entre eles, os mais abundantes foram as formigas dos seguintes gêneros: *Labidus* (86%), *Wasmannia* (6,64%), *Pheidole* (2,85%), *Solenopsis* (1,39%), *Atta* (1,32%), *Dorymyrmex* (0,59%). *Wasmannia* foi detectada em todas as coletas e a na primeira, segunda e quinta coletas foram coletadas rainhas. Os dados foram submetidos a uma PERMANOVA e não se observou resultado significativo para os tratamentos. Houve efeito de bloco e coleta que foi interpretada como tempo decorrente após a última aração. Estes resultados de abundância total e o da presença de indivíduos de castas reprodutivas são suficientes para sustentar ao menos quatro afirmações: (i) houve a colonização das parcelas ao final do experimento com o efeito significativo da coleta ($p < 0,001$) devendo este efeito ser imputado ao tempo decorrente desde a última aração, (ii) houve um aumento da abundância das espécies residentes como se pode inferir nas análises gráficas, (iii) não houve efeito dos tratamentos e (iv) a perturbação antrópica aqui representada pela aração na ocasião da implantação do experimento tende a reduzir a abundância e a diversidade de espécies coocorrentes e favorecer formigas com capacidade de colonizar áreas perturbadas como *Wasmannia*, *Pheidole*, *Solenopsis* e *Dorymyrmex*, todas representadas nos resultados aqui expostos. Logo se não houve efeito dos tratamentos há de se recomendar que se mantenha uma cobertura vegetal ainda que espontânea e que estes refúgios não sejam submetidos ao revolvimento do solo se mantendo assim a mirmecofauna edáfica nos cordões de vegetação próximo aos cultivos.

Palavras chave: Macrofauna. Serviços ecossistêmicos. Aração.

4.2 ABSTRACT

In a perspective of sustainable management of agroecosystems, one of the strategies to implement a conservative biological control involves the use of attractive plant crops, these plants can provide food resources and refuge for natural enemies. To verify the effectiveness of the method and the attraction of the community of ants, the activity of terrestrial arthropods was recorded in a Abruptic Acrisol (Dystic) for six months, from June to December 2017, in an experiment involving attractive plants, in the experimental field of Embrapa Agrobiologia in the city of Seropédica, RJ, Brazil. Attractive plants included *Crotalaria spectabilis* Röth., *Canavalia ensiformis* (L.) DC., *Cosmos sulphureus* Cav., *Foeniculum vulgare* Mill. and spontaneous vegetation. The capture of arthropods was carried out with pitfall traps left in the field for seven days. Several groups of arthropods were collected among them, the most abundant were ants of the following genera: *Labidus* (86%), *Wasmannia* (6.64%), *Pheidole* (2.85%), *Solenopsis* (1.39%), *Atta* (1.32%), *Dorymyrmex* (0.59%). *Wasmannia* was detected in all collections and queens were collected in the first, second and fifth collections. The data were submitted to a PERMANOVA and there was no difference among the treatments. There was a block and sample effect that was interpreted as the time elapsed after the last plowing. I argued that these results of total abundance and that of the presence of individuals of reproductive casts are sufficient to support at least four statements: (i) there was the colonization of the plots at the end of the experiment with the significant effect of the collection ($p < 0.001$) and this must effect to be attributed to the time elapsed since the last plowing, (ii) there was an increase in the abundance of resident species as can be inferred in the graphical analyzes, (iii) there was no effect of the treatments and (iv) the anthropic disturbance represented here by the plowing in when the experiment was implemented tends to reduce the abundance and diversity of co-current species and favor ants with the capacity to colonize disturbed areas such as *Wasmannia*, *Pheidole*, *Solenopsis* and *Dorymyrmex*, all represented in the results presented here. Therefore, if there was no effect of the treatments, it is recommended to maintain a vegetation cover, even if spontaneous, and to keep these refuges without tillage, thus maintaining the edaphic myrmecofauna in the vegetation buffer strips close to the crops.

Keywords: Macrofauna. Ecosystem services. Plowing.

4.3 INTRODUÇÃO

Na literatura são identificadas duas formas de controle biológico, o conservativo e o clássico. O primeiro, busca promover e manter os serviços ecossistêmicos providos pelos inimigos naturais, que são capazes de controlar organismos com potencial de se tornarem pragas para espécies de importância agronômica (SHIELDS et al., 2019). No controle biológico clássico estes inimigos naturais podem ser criados em laboratório e introduzidos de forma massiva nas áreas de interesse sendo esta a abordagem mais comum e se baseia mais na mentalidade de produto do que na de manejo da paisagem (EILENBERG; HAJEK; LOMER, 2001; HOWARTH, 1991).

Neste estudo, que é um recorte de estudo que abordou organismos já amplamente aceitos em práticas de controle biológico, como os coccinelídeos e percevejos predadores, foi testada a ocupação de áreas cultivadas com plantas atrativas por formigas. Entende-se que em grande parte as formigas são predadoras generalistas o que as torna por sua vez organismos com potencial de controle biológico de ocorrência natural (ARMBRECHT; GALLEGOS, 2007; DASSOU; TIXIER, 2016; MONTEIRO; SUJII; MORAIS, 2008).

As formigas diferem dos grupos citados mais evidentemente por não serem aladas, por serem insetos sociais e por nidificarem no solo. Somente na fase reprodutiva da colônia são produzidos machos e fêmeas férteis alados, e estes são capazes de promover a colonização de novas áreas. Por serem insetos sociais as formigas podem recrutar operárias para a captura e transporte de presas de diversos tamanhos, inclusive presas como tamanho e peso muito superior ao da média das operárias da colônia, adicionalmente as necessidades nutricionais da colônia vão influenciar na frequência da coleta e remoção de insetos fitófagos (CASSILL; TSCHINKEL, 1999; PORTHA; DENEUBOURG; DETRAIN, 2002). A terceira característica se refere as formigas edáficas, que são sensíveis a perturbação do solo, da cobertura vegetal e da fragmentação da paisagem.

De posse destas informações se buscou entender como o plantio de cultivos atrativos poderia atrair e manter comunidades de formigas edáficas visando sua utilização como inimigos naturais de pragas agrícolas.

4.4 REVISÃO DE LITERATURA

Em sistemas agrícolas com orientação conservativa, o enriquecimento florístico através da diversificação de cultivos ou do plantio de espécies atrativas ou que sirvam de refúgio para inimigos naturais pode emular uma condição anterior de diversidade mantendo os serviços ecossistêmicos de alguns insetos benéficos e prejudicando a reprodução ou dispersão de insetos praga em sistemas "push-pull" – (MIDEGA et al., 2008, 2009) baseados em atração ou repelência de determinados insetos praga podendo empregar diferentes espécies com estas características protegendo assim a espécie cultivada comercialmente ou "trap cropping" no qual se utilizam plantas armadilha de modo que estas atuem como sumidouros de pragas (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006). Até mesmo o uso de plantas com a função de cobertura do solo podem ter efeitos benéficos que vão além da proteção contra a erosão, alterando a dieta de predadores generalistas como as formigas (MOLLOT et al., 2014). Todos estes métodos são intensivos em termos de uso de conhecimento tanto da planta empregada como atrativa/repelente/armadilha quanto da planta de interesse, planta essa que em situação distinta pode ser utilizada como atrativa como no caso do milho (RHINO et al., 2014; SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006).

A função dos plantios de cobertura em agroecossistemas visam reduzir os impactos ambientais negativos da agricultura e prover serviços ambientais, sendo cultivados visando reduzir a lixiviação do nitrogênio, servir de adubação verde, incrementar a produção de biomassa para incorporação de carbono ao solo, promover controle de vegetação espontânea e fixação de nitrogênio (TRIBOUILLOIS et al., 2015). O controle de populações de organismos potencialmente danosos às culturas agrícolas de maneira planejada ou incidental também é uma das funções dos plantios de cobertura (ALTIERI; SCHMIDT, 1985; LESLIE et al., 2017) e a interface entre os plantios de cobertura e as formigas (Hymenoptera: Formicidae) é o assunto desta breve revisão.

Comumente as formigas são estudadas em contexto de desserviços e não de serviços ecossistêmicos, nos quais são amplamente relevantes (WIELGOSS et al., 2014). Destaca-se também que em um universo de mais de 12000 espécies de formigas apenas poucas espécies têm algo mais do que sua taxonomia definida, isto é, pouco se sabe sobre sua ecologia ou fisiologia limitando assim a compreensão a respeito de seus potenciais efeitos na prestação de serviços ecossistêmicos (DEL TORO; RIBBONS; PELINI, 2012).

Dentre os efeitos benéficos já registrados para Formicidae em agroecossistemas sabe-se que em lavouras de café foi observada a relação benéfica entre aranhas do gênero *Pocobletus* sp. e formigas arbóreas *Azteca sericeasur*. Neste caso as aranhas – importantes predadores – tem sua abundância positivamente correlacionadas com a presença desta formiga que indiretamente as beneficiam ao patrulhar as plantas protegendo as aranhas da predação e ainda garantindo que uma maior disponibilidade de insetos por diminuir a competição (MARÍN; JACKSON; PERFECTO, 2015). São conhecidos efeitos diretos e indiretos no controle biológico de diversas espécies incluindo o bicudo do algodoeiro, lagarta da soja e mosca branca em diferentes tipos de cultivo agrícola e áreas de pastagem (EUBANKS, 2001). Se conhece também ações de controle da broca do café (ARMBRECHT; GALLEGOS, 2007). Foram descritos efeitos repelentes em *Raphidopalpa foveicollis* (Coleoptera: Chrysomelidae) (AGARWAL; RASTOGI, 2008), predação de larvas de curculionídeos em citros (STUART; JACKSON; MCCOY, 2003) e moleque da bananeira em bananais com plantio de braquiária para cobertura do solo (MOLLOT et al., 2014).

A distribuição das formigas depende da disponibilidade de recursos alimentares, locais disponíveis para nidificação e ocorrência de perturbações e variações no microclima, em especial variações na umidade do solo e até mesmo do microbioma do solo, sendo que o uso de agrotóxicos e práticas de manejo do solo como a aração tendem a influenciar significativamente

na composição e atividade da mirmecofauna geralmente resultando em uma diversidade menor de espécies em áreas cultivadas (HUANG et al., 2020; KASPARI; WEISER, 2000; LEVINGS; FRANKS, 1982; LOBRY DE BRUYN, 1999).

Já em ambientes naturais, as plantas mirmecófitas são um modelo passível de gerar informações para se entender as relações entre plantas não estritamente mirmecófitas, chamadas mirmecófilas (HEIL; MCKEY, 2003). As mirmecófilas possuem estruturas como nectários extraflorais (EFNs) e corpos alimentares (food bodies, pearl bodies) que possuem basicamente três tipos e duas origens celulares, tricomas e células do parênquima (BENTLEY, 1977; O'DOWD, 1982). Estas estruturas não são exclusivas de plantas não domesticadas estando presente em gêneros como *Andropogon*, *Piper*, *Gossypium*, *Manihot*, *Ipomoea*, *Hevea*, *Ricinus*, *Passiflora*, *Pyrus*, *Vitis* e *Vicia* (BENTLEY, 1977; O'DOWD, 1982). A simbiose observada entre as formigas e as mirmecófitas são produto de uma coevolução e incluem além da proteção contra herbivoria, alimentação e transporte, podendo variar em intensidade de uma relação oportunista a uma facultativa chegando até a uma relação obrigatória no caso de plantas com domáceas (HEIL; MCKEY, 2003).

Na situação mais comumente encontrada em agroecossistemas as relações tendem a ser não simbióticas, com plantas mirmecófilas que oferecem recompensas alimentares como dito anteriormente através de EFNs e tricomas secretores estabelecendo assim relações facultativas e oportunistas e sem oferecer locais para a nidificação na própria planta como nas mirmecófitas (HEIL; MCKEY, 2003). Dentre as plantas utilizadas como adubo verde e plantas de cobertura temos a presença de EFNs nas leguminosas *Mucuna*, *Pueraria*, *Calopogonium*, *Canavalia*, *Chamaecrista*, *Crotalaria*, *Dolichos*, *Indigofera*, *Lotus*, *Phaseolus*, *Pueraria*, *Senna*, *Vicia*, *Vigna*, e na gramínea *Penisetum* (HARVEY, 2009; LERSTEN; BRUBAKER, 1987; WEBER; PORTURAS; KEELER, 2015).

Os agroecossistemas mesmo se completos, ou seja, conduzidos com manejo conservacionista (orgânico, biodinâmico, natural) são ecossistemas perturbados (PERFECTO; VANDERMEER, 2010). Tais perturbações tendem a resultar em danos relevantes em cultivos comerciais ou de subsistência ao beneficiar guildas de formigas que são hábeis em explorar áreas abertas (KWON; LEE; SUNG, 2014). Nas condições brasileiras temos as cortadeiras representadas pelas saúvas (*Atta* sp.) e as quenquém (*Acromyrmex* sp.) e as formigas de fogo (*Solenopsis* sp.) que perfazem praticamente a quase totalidade das formigas notadas pelos agricultores, seja pelo dano aos cultivos das duas primeiras ou seja pela picada dolorosa da última. Mas os efeitos perceptíveis apenas com a elaboração de questões científicas mostram que os efeitos vão além das picadas e destruição de cultivos, como as pilhas de despejo de resíduos da formigas *Acromyrmex lobicornis* que são responsáveis por um incremento na atividade da microbiota, medida através da emissão de CO₂, em até 160 vezes quando comparada a superfícies sem influência recente das formigas (FERNANDEZ; FARJIBRENER; SATTI, 2014), ou ainda em um incremento no intemperismo de rochas silicatadas na ordem de mais de 300 vezes (DORN, 2014).

Como muitos outros organismos, as formigas são afetadas pela ação antrópica e suas comunidades por vezes são severamente simplificadas (HOLWAY; SUAREZ, 2006) e em geral apenas estas comunidades simplificadas são notadas pelos agricultores e pesquisadores da área agrícola. Conservar a agrobiodiversidade fora das "áreas de conservação" e manter ou incrementar a produção agrícola através desta conservação é um desafio que vem sendo colocado aos profissionais que manejam agroecossistemas em busca de um melhor manejo do solo favorecendo a manutenção de seu componente vivo (ISBELL et al., 2015; LAL, 2016).

Uma das soluções deste desafio passa pelo cultivo de cobertura (SCHIPANSKI et al., 2014) que tende a fazer o uso de serviços ecossistêmicos de ocorrência natural que geralmente passam despercebidos ou são subestimados mas que possuem efeitos positivos sobre os cultivos (EVANS et al., 2011).

Os cultivos de cobertura tendem incrementar a biodiversidade do solo e se bem planejados e manejados podem controlar pragas específicas tanto pelo aumento e manutenção de populações de predadores como de parasitóides (ALTIERI; SCHMIDT, 1985). O uso de plantas de cobertura aumenta a oferta de biomassa que pode ser traduzida em uma nova fonte de energia para o agroecossistema e alterar as chances de pragas se tornarem presas de predadores generalistas como observado em bananeais onde o uso de plantas de cobertura aumentou o sucesso de *Solenopsis geminata* em capturar *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera, Curculionidae) (MOLLOT et al., 2012). O aumento de permeabilidade da matriz e alteração do microclima na superfície do solo tem efeitos não só na dieta das formigas mas na dieta dos predadores em geral (MOLLOT et al., 2014). É notável que nos dois últimos exemplos a planta utilizada como cobertura, a braquiária (*Urochloa*), não possui nectários ou corpos alimentares o que não impede a percepção de efeitos positivos no controle de pragas.

Em contraste foi observado um efeito neutro dos plantios de cobertura, a saber *Pisum sativum* e *Secale cereale* sobre predadores em áreas de cultivo de milho transgênico com aplicação de herbicidas no estado de Michigan (E.U.A.) para geração de bioenergia, onde há a remoção da planta inteira (FOX et al., 2016a). Trata-se de um sistema localizado em um dos extremos da gama de utilização de plantios de cobertura. Fica evidenciado que o mero plantio de cobertura por si só não carrega a solução final para a degradação dos agroecossistemas e a perda da biodiversidade em especial no tocante às espécies de artrópodes predadores e parasitoides onde devem ser observadas as condições físicas. Ou seja, não se pode solicitar ajuda ou fornecer abrigo a organismos que estão fora de alcance do sinal emitido ou que não possuam meios de entender e responder ao sinal recebido (MITHÖFER; BOLAND, 2016; SHANNON, 1948). Este “efeito” neutro, apesar de não ter sido tratado assim pelos autores, acaba por reforçar a necessidade do manejo adequado do entorno, ou seja da matriz agroecológica na qual os cultivos econômicos e de cobertura estão ou serão implantados (PERFECTO; VANDERMEER, 2010; TSCHUMI et al., 2016).

Mas nem sempre os exemplos são desanimadores. Um destes é a predação de sementes de plantas espontâneas por besouros carabídeos que foi incrementada em 73% quando comparada a áreas com solo exposto (BLUBAUGH et al., 2016). Estes besouros são onívoros e a capacidade de se alimentar de sementes os mantém na área ao permitir que sobrevivam em momentos onde a disponibilidade de artrópodes presa esteja reduzida (BLUBAUGH et al., 2016). De maneira similar raras são as formigas estritamente predadoras e seria razoável esperar que os cultivos de cobertura aumentem a chance de permanência em sua área de influência de formigas onívoras, incluídas aqui de maneira semelhante, as formigas que assim como os carabídeos, possuem hábitos como predação de sementes em momentos de escassez de presas (CARROLL; JANZEN, 1973).

Em outra circunstância em um pomar de pera (*Pyrus*) com cultivos de leguminosas como plantas de cobertura, foi aspergida nas plantas de cobertura uma solução com albumina de ovo para permitir a posterior detecção de antígeno estranho aos artrópodes e ao ambiente através do teste ELISA (HORTON; JONES; UNRUH, 2009). Mais de 90% dos predadores generalistas dos grupos Heteroptera, Coccinellidae, Chrysopidae e Araneae coletados nas plantas de cobertura adquiriram o marcador de albumina de ovo e entre 17 a 29% dos coletados na copa apresentavam sinais de terem forrageado ou se originado no cultivo de cobertura com leguminosas (HORTON; JONES; UNRUH, 2009). Os autores não fazem referência a formigas, o que é compreensível, pois já se sabe que uma das possíveis causas da maior abundância de presas pouco móveis como as larvas de Lepidoptera no Hemisfério Norte se deve a uma menor abundância e atividade de artrópodes predadores em especial de formigas arbóreas nesta parte do globo (NOVOTNY et al., 1999; ROSLIN et al., 2017).

Mas de nenhuma forma os resultados sobre os efeitos dos plantios de cobertura são triviais. O efeito dos experimentos dos plantios de cobertura podem não refletir na

produtividade da cultura ou nos artrópodes predadores que exploram as folhas do cultivo mas podem ter efeitos positivos na biota do solo ou em parte da biota do solo como nematóides de vida livre (LESLIE et al., 2017). Talvez haja uma necessidade de adequação da experimentação agrícola nestes casos. No experimento de LESLIE e colaboradores (2017) todos os 4 tratamentos estavam restritos a uma área de menos de meio hectare (0,45 ha) e os efeitos sobre a fauna de predadores e a produtividade podem ser dependentes de fatores como continuidade e conectividade dos recursos e a presença de fontes próximas de inimigos naturais como frizado anteriormente (CHUST et al., 2003; KASPARI; WEISER, 2007). A interação predador presa também pode ser afetada pela capacidade de uso do habitat e escala, devendo-se ter parcimônia ao tirar conclusões para escalas distintas (MORRIS, 1987). A presença ou a ausência de coespecíficos também podem ser determinantes na atração de outros indivíduos oriundos de áreas próximas podendo representar o sucesso ou não da colonização de um habitat (AHLERING; FAABORG, 2006). Posso concluir que esta visão pontual não tem se mostrado adequada para o entendimento de como plantas podem atrair insetos úteis para sua proteção em agroecossistemas e há a necessidade de integração com áreas como a Ecologia de paisagens e a Ecologia química.

A comunicação química entre organismos se baseia em semioquímicos e feromônios, dois grandes grupos de substâncias orgânicas voláteis e instáveis. A comunicação química entre as plantas e os insetos, sejam predadores ou fitófagos, ocorre através dos semioquímicos que são moléculas com composição química diversa emitidas através de mecanismos que envolvem a detecção e resposta de padrões moleculares associados a danos (DAMPs - damage associated molecular patterns) (DURAN-FLORES; HEIL, 2014; REDDY; GUERRERO, 2004). Em feijão a capacidade de induzir resistência a doenças e a reconhecer danos na própria planta ou em plantas da mesma espécie próximas ocorre com os DAMPs estimulando a produção de ácido jasmônico que por sua vez estimula os EFNs, sendo que este estímulo pode ser previsto antecipadamente através da análise do perfil de radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (DURAN-FLORES; HEIL, 2014). De que maneira estes mecanismos de estímulo-resposta ocorrem nas outras leguminosas que também possuem EFNs é algo a ser descrito, mas o estudo de DURAN-FLORES e HEIL (2014) demonstrou que a resposta é taxonomicamente dependente, sendo sensível até mesmo aos cultivares usados na elaboração do extrato. Se os danos às folhas induzem essa cascata de eventos culminando com o estímulo dos EFNs e estes estão presentes em diversas espécies de leguminosas usadas como adubação verde e cultivo de cobertura como o kudzu, a mucuna, a fava dentre outros, é de se esperar que este mecanismo seja útil para recrutar predadores capazes de deter o avanço de herbívoros (BENTLEY, 1977; HARVEY, 2009; KATAYAMA; SUZUKI, 2004; LERSTEN; BRUBAKER, 1987).

Os feromônios, por sua vez, são substâncias secretadas por um indivíduo que visa induzir uma reação específica em outro indivíduo coespecífico e a composição e a quantidade do feromônio podem variar conforme o sinal que se deseja emitir, da gravidade da situação enfrentada pelo emissor e a urgência da resposta requerida (CZACZKES; GRÜTER; RATNIEKS, 2015; WILSON, 1976). São crescentes as evidências de que as plantas se comunicam entre si através de sinais químicos (DURAN-FLORES; HEIL, 2014; HEIL; SILVA BUENO, 2007). A comunicação entre plantas, entre partes específicas da planta como as flores e insetos polinizadores (BAGGEN; GURR; MEATS, 1999), a emissão de compostos que atraíam nematóides predadores ou fitopatogênicos, a comunicação mesmo que involuntária entre insetos pragas e seus parasitoides e predadores são nós em uma rede de comunicação antiga (MITHÖFER; BOLAND, 2016). Estas redes inseridas nos agroecossistemas necessitam ser estudadas, compreendidas e conduzidas visando o aumento da sustentabilidade e saúde dos agroecossistemas incluindo o ecossistema solo (DIXON et al., 2002; HEIL, 2014; HOOPER et al., 2005; PONGE, 2015, 2013; VAN DAM; BOUWMEESTER, 2016).

As teias de relações se tornaram tão intrincadas ao longo da evolução que insetos podem, ou melhor, necessitam, usar compostos de plantas como precursores de feromônios sexuais, ou seja, sem as plantas com seus compostos, o sucesso reprodutivo de diversas espécies estaria praticamente inviabilizado (REDDY; GUERRERO, 2004). Com esses múltiplos sinais sendo emitidos simultaneamente o cenário hipotético mais prontamente imaginável pode ser um que inclua modelos de moléculas de semioquímicos e feromônios ao vento sendo dispersados e dissipados. Porém esta sinalização é importante também no corpo do solo e possui implicações relevantes ao sucesso das culturas (VAN DAM; BOUWMEESTER, 2016). A conexão entre os processos acima e abaixo do solo sempre que possível deve ser levada em consideração pois dentre outros fatores muitas das pragas agrícolas passam parte de seu ciclo de desenvolvimento no solo (BARDGETT et al., 2005; BARDGETT; MOMMER; DE VRIES, 2014; VAN DER PUTTEN et al., 2009). Outra situação que ilustra a complexidade a ser desvendada é a interação entre formigas e a alteração da composição química de nectários em decorrência da visita das formigas aos mesmos. Tal mudança é mediada por alterações no microbioma, mais especificamente pela inoculação de leveduras no momento da visita das formigas. Tais leveduras passam a consumir os açúcares presentes no néctar aumentando a concentração de frutose e glicose e reduzindo a de sacarose (DE VEGA; HERRERA, 2013). O quanto estas duas situações se replicam nas relações inseto-plantas e em especial na relação formiga-planta é uma grande incógnita. É importante frisar que vários processos baseados em semioquímicos que sozinhos seriam ineficientes quando juntos, como em um cultivo diversificado e com uma diversidade expressiva de plantas de cobertura por exemplo, tendem a formar uma proteção eficiente e robusta (PICKETT et al., 2014).

Devemos sempre nos atentar que a atração de insetos não é exclusiva para insetos benéficos e algumas relações podem não ser desejáveis para áreas cultivadas e o emprego de algumas plantas de cobertura deve ser pensado com zelo. Em um estudo de relações tri-tróficas envolvendo o feijão fava (*Vicia faba*) e a traça da batatinha (*Pthorimaea operculella*) uma praga importante, se observou que a visita aos nectários de *Vicia* resultaram em um incremento na longevidade de machos e fêmeas, aumento na duração do período de oviposição, na fecundidade e ainda na taxa média de oviposição e do número de ovos no ovário de fêmeas mortas (BAGGEN; GURR; MEATS, 1999). O emprego de uma planta com este potencial de favorecer uma praga relevante pode levar à rejeição de uma prática útil e válida, se tornando um risco a ser levado em conta numa realidade onde poucos estudos existem a respeito da interação planta-inseto para adubos verdes e plantas de cobertura nos trópicos.

Atualmente já existem produtos que podem ser aplicados para conferir resistência a plantas, chamados de elicitores ou fortalecedores de sinal como o BHT (SOBHY; ERB; TURLINGS, 2015). Apesar disto o uso de plantas atrativas é uma solução factível baseada em conhecimentos de ecologia química, ecologia de paisagens, interação inseto-planta e dinâmica de populações ou seja é uma opção viável que requer alto uso de conhecimento com capacidade de prover soluções e manter serviços ambientais que não podem ser obtidos com a aplicação de produtos (GABA et al., 2015; SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006).

4.5 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em experimento de campo implantado em área adjacente ao SIPA, o campo experimental da Embrapa Agrobiologia localizado em Seropédica, RJ (latitude 22° 44' S, longitude 43° 40' O e altitude em torno de 25 m), numa região da Baixada Fluminense de relevo suave ondulado e com solo classificados como PLANOSSOLO.

4.5.2 Plantas utilizadas e desenho experimental

Foi instalado em abril de 2017 com início do plantio em maio do mesmo ano o experimento em blocos inteiramente casualizado com parcelas de 3,0 x 4,0 m, constituídas de 6 linhas espaçadas de 0,50 m e com 4,0 m de comprimento contendo as seguintes coberturas vegetais: *Cosmos sulphureus* (cosmos, Asteraceae), *Canavalia ensiformis* (feijão de porco, Fabaceae), *Crotalaria spectabilis* (crotalária, Fabaceae), *Foeniculum vulgare* (erva-doce, Apiaceae) (Tabela 1), e tendo como controle a vegetação espontânea. Dentre as quatro coberturas vegetais foram estabelecidos três níveis de consórcio conforme descrito ainda na Tabela 1.

Tabela 1. Número de plantas por linha (4m) adotado no plantio do experimento.

Tipo de cultivo	Espécies	Densidade (por linha)	Espaçamento entre plantas (cm)
Solteiro	<i>Crotalaria spectabilis</i>	15	7
	<i>Canavalia ensiformis</i>	3	33
	<i>Cosmos sulphureus</i>	4	25
	<i>Foeniculum vulgare</i>	2	50
Consórcio 1	<i>Crotalaria spectabilis</i>	15	27
	<i>Canavalia ensiformis</i>	3	133
	<i>Cosmos sulphureus</i>	4	100
	<i>Foeniculum vulgare</i>	2	200
Consórcio 2	<i>Crotalaria spectabilis</i>	20	20
	<i>Canavalia ensiformis</i>	4	100
	<i>Cosmos sulphureus</i>	5	75
	<i>Foeniculum vulgare</i>	3	150
Consórcio 3	<i>Crotalaria spectabilis</i>	30	13
	<i>Canavalia ensiformis</i>	6	67
	<i>Cosmos sulphureus</i>	8	50
	<i>Foeniculum vulgare</i>	4	100

As parcelas foram separadas entre si por distância de 5 metros lineares, que foi mantida livre de vegetação por capina mecânica periódica nas semanas distintas às das coletas, e foi utilizada irrigação por aspersão. De março a abril de 2017 a área foi mantida livre de vegetação com o uso de arado. Em 15 de maio foi feito o transplantio das plantas de erva doce, crotalária e cosmos e no dia 23 do mesmo mês foi feito o plantio do feijão de porco. Nestas duas datas foi aplicado formicida para o controle de saúvas (Attamix 400P, Insetimax) nos olheiros.

Foram realizadas cinco coletas da mirmecofauna ativa na superfície do solo, mensalmente, entre junho e outubro de 2017. As coletas foram feitas com 38, 67, 99, 130 e 160

dias após o plantio, respectivamente, nos dias 22/06, 21/07, 22/08, 22/09 e 22/10/2017. Para tal foram instaladas armadilhas de queda tipo *pitfall* compostas de potes com 100mm de abertura enterrados ao nível do solo, contendo solução de formol a 1% mantidos em campo por sete dias (BROWN; MATTHEWS, 2016; MAJER, 1997). O material coletado foi levado ao Laboratório de Fauna da Embrapa Agrobiologia e os artrópodes foram separados por ordem e as formigas identificadas por gênero segundo BACCARO (2006).

4.5.3 Análise estatística

Foi utilizada análise multivariada de variância permutacional (PERMANOVA), pois este teste não é sensível a presença de zeros na matriz, o que ocorre com frequência no conjunto de dados. Este teste não paramétrico é usado para comparar grupos de objetos e testar a hipótese nula de que os centróides e a dispersão dos grupos, conforme definido pelo espaço de medida, são equivalentes para todos os grupos (ANDERSON, 2017). Foi utilizada a distância euclidiana para os cálculos utilizando o pacote Vegan no programa R (R CORE TEAM, 2018). Apesar ser um teste que não necessita de distribuição normal dos dados foi feita a transformação $\log(n+1)$ nos dados de abundância devido à presença massiva de indivíduos de formiga de correição, que superou mais de mil indivíduos em algumas amostras, enquanto a maioria das demais formigas estavam na casa das dezenas (MCNATTY; ABBOTT; LESTER, 2009).

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários grupos de artrópodes foram coletados dentre eles o mais abundante foi Formicidae, sendo identificados 25.301 indivíduos de formigas incluindo operárias, machos e rainhas. Dentre as formigas se destacaram em ordem de ocorrência no total coletado os gêneros: *Labidus* (86%), *Wasmannia* (6,64%), *Pheidole* (2,85%), *Solenopsis* (1,39%), *Atta* (1,32%), *Dorymyrmex* (0,59%). Se optou por manter a identificação no nível taxonômico de gênero para as análises estatísticas com base no conceito de suficiência taxonômica. Este conceito permite ao mesmo tempo, reter a informação e reduzir o tempo de laboratório e ainda evitar erros com inconsistências na determinação de espécies ou morfotipos que são mais sujeitos a subjetividade do parataxomista (SOUZA; MOURA; FRANKLIN, 2009). Este último fator pode se agravar em gêneros como *Dorymyrmex* que possui cerca de 90 espécies, muitas não descritas, apresenta variações de cor e ornamentação dentro da própria espécie e carece de uma chave taxonômica ampla para espécies (CUEZZO; GUERRERO, 2012).

O gênero mais abundante nas amostras (Figura 27) pertence ao grupo das formigas legionárias ou de correição (KRONAUER, 2009), que são essencialmente predadoras de topo e se alimentam através de ações organizadas com um grande número de operárias em frentes denominados *raids* (SCHNEIRLA, 1934) capazes de remover grande quantidade de biomassa de artrópodes modulando assim a fauna do solo e da serapilheira (KASPARI et al., 2011; SCHÖNING; MOFFETT, 2007; SOUZA; MOURA, 2008). Uma vez que o objetivo deste estudo é o de se entender a colonização de áreas com cultivos de plantas atrativas as formigas do gênero *Labidus* coletadas são tratadas neste estudo em separado das demais quanto à interpretação dos resultados, pois são consideradas como não residentes. É necessário ressaltar ainda que sua presença é altamente desejável dado ao seu potencial de eliminar imaturos de artrópodes (KASPARI et al., 2011; KASPARI; O'DONNELL, 2003; ROBERTS; COOPER; PETIT, 2000). A maioria dos registros sobre *Labidus* e outras formigas de correição neotropicais remetem a áreas de floresta (KUMAR; O'DONNELL, 2009; ROBERTS; COOPER; PETIT, 2000; SCHNEIRLA, 1933). O acesso das *Labidus* ao local do experimento foi possível pois as mesmas se deslocam ao longo da vegetação espontânea remanescente, à margem dos acessos e no entorno do experimento, como observado pelo autor em 21/07/17 durante a implantação das armadilhas para a segunda coleta. Esta vegetação, aparentemente, fornece proteção suficiente as formigas contra a exposição solar e dissecação uma vez que estas forrageiam na superfície.

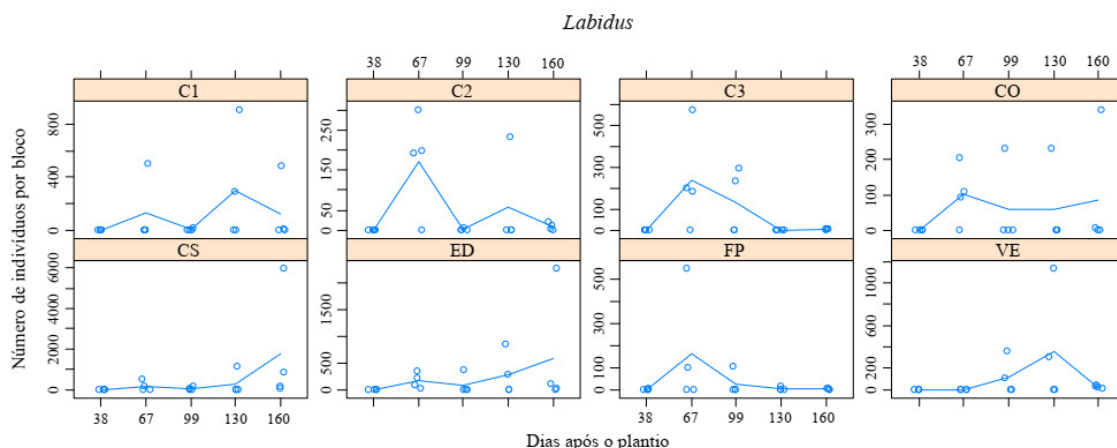


Figura 27. Número de indivíduos de *Labidus* em por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

O segundo gênero mais abundante *Wasmannia* (Figura 28) é reconhecido por sua capacidade de dominar áreas antropizadas (FOUCAUD et al., 2009), e ainda por deslocar espécies locais onde se torna espécie invasora (JOURDAN, 1997). As evidências para explicar a dominância ecológica destas formigas no presente estudo se baseiam em um estudo experimental conduzido com *Solenopsis invicta* Buren (KING; TSCHINKEL, 2008). Tal estudo utilizou um desenho fatorial com dois tipos de perturbação antrópica (aração e capina) e com ou sem a introdução de ninhos de *Solenopsis* e mostrou que a perturbação, especialmente por aração reduz a abundância e diversidade de outras espécies de formigas que ocorrem no local de estudo, com o pior cenário onde foi feita a aração e a introdução de ninhos (KING; TSCHINKEL, 2008).

Assim sendo ficou evidenciada a máxima de que “o inimigo de meu inimigo é meu amigo” e este princípio aparenta ter influenciado os resultados desse estudo, ou seja, uma vez que se elimina a mirmecofauna local através do revolvimento mecânico do solo as formigas com potencial de se tornarem dominantes têm como aliado importante os humanos. *Wasmannia* foi detectada em todas as coletas (Figura 28) e a na primeira, segunda e quinta coletas foram coletadas rainhas. Uma das formas deste gênero se dispersar inclui rainhas fundadoras, de origem clonal ou não, acompanhadas de operárias do ninho materno (FOUCAUD et al., 2009, 2010). Nesse estudo todas as ocasiões em que foram coletadas rainhas de *Wasmannia* elas foram coletadas com operárias. Outra possibilidade a ser verificada, também com base em informação existente para *Solenopsis*, descrita no capítulo II dessa tese, é a da capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Advoga-se que esta capacidade apresentada por formigas com presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em seu microbioma pode se confirmar como um holofenótipo importante para outros holobiontes com capacidade de colonizar áreas perturbadas.

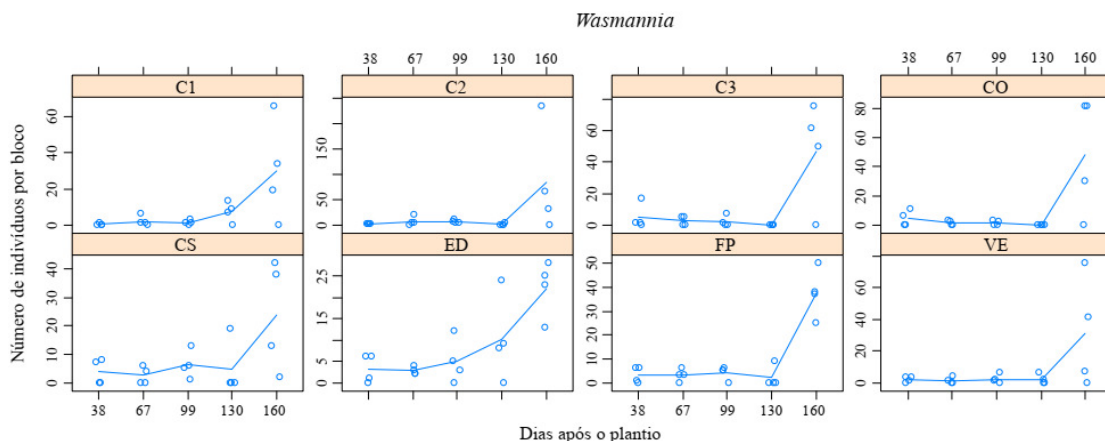


Figura 28. Número de indivíduos de *Wasmannia* por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

O terceiro e quarto gêneros mais abundantes, *Pheidole* e *Solenopsis*, tiveram rainhas detectadas nas amostras da quinta e última coleta o que indica a formação de colônias nas parcelas do experimento (Figuras 29 e 30). Como a metodologia de armadilha de queda tipo *pitfall* coleta apenas as formigas ativas, poderia suscitar o argumento de que estas rainhas fossem fundadoras, mais especificamente, rainhas que estariam chegando no local da parcela e foram coletadas enquanto buscavam local de nidificação. O mais provável é que esteja ocorrendo a formação de colônias, pois colônias incipientes podem modificar o local do ninho, o que não limita a coleta apenas a formigas vindas de fora da parcela, ou seja de outras colônias. Outra evidência para a interpretação de que se trata de rainhas de colônias já estabelecidas, logo testemunhas destas colônias, é que em sua maioria elas foram coletadas com operárias do mesmo gênero.

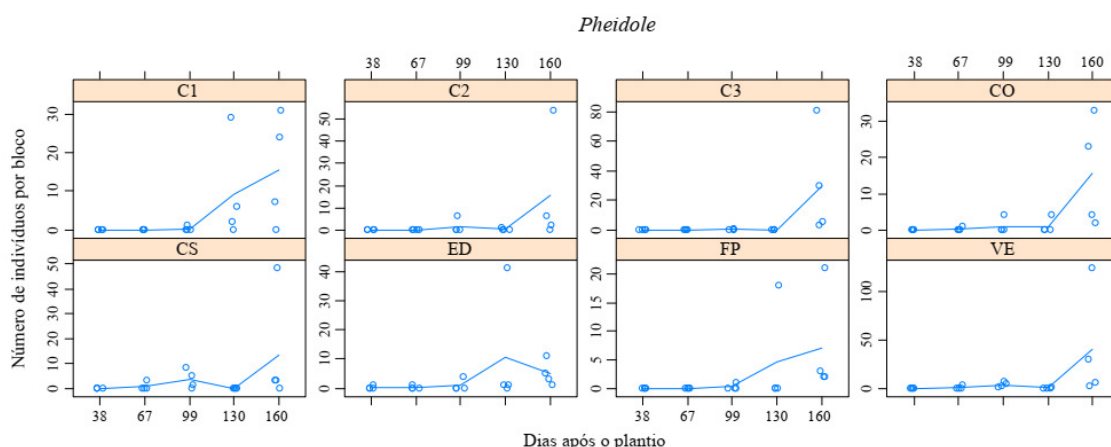


Figura 29. Número de indivíduos de *Pheidole* coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

Pheidole é um gênero megadiverso com mais de mil espécies e com ampla plasticidade de comportamento e de formas de obtenção de recursos alimentares, que variam do parasitismo social à predação (LACH; PARR; ABBOTT, 2010; MARÍN; JACKSON; PERFECTO, 2015; VAN DEN BERG, 1993), com hábitos de nidificação em diferentes estratos inclusive no solo (BACCARO et al., 2015). O quarto gênero mais abundante foi *Solenopsis* que abrange as formigas conhecidas como lava-pés ou formigas de fogo, tidas como formigas generalistas mas com potencial de predação considerável, dada sua capacidade de recrutamento (EUBANKS, 2001; MOLLOT et al., 2014; STILES; JONES, 2001). *Pheidole* e *Solenopsis* tendem a competir por recursos e em alguns casos se conhecem reações agressivas e de defesa elicitadas em ninhos de *Pheidole* apenas quando estes são atacados por *Solenopsis* (WILSON, 1976).

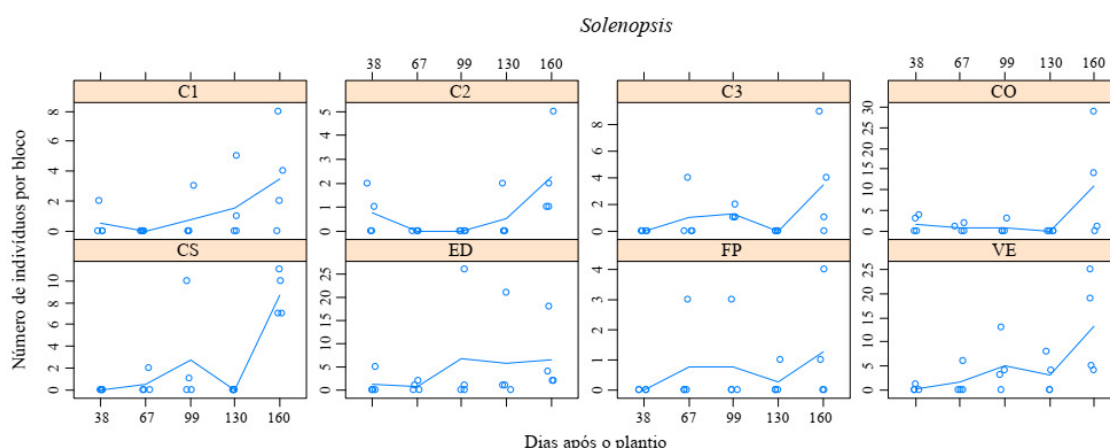


Figura 30. Número de indivíduos de *Solenopsis* coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

O quinto gênero mais coletado foi *Atta* que corresponde a formigas cortadeiras conhecidas como saúvas (Figura 31). Estas como informado na metodologia foram alvo de controle químico no início do experimento, porém sua abundância flutuou pouco ao longo do experimento, o que pode ser explicado pelo fato que a parte central de seu ninho estava localizada fora da área do experimento.

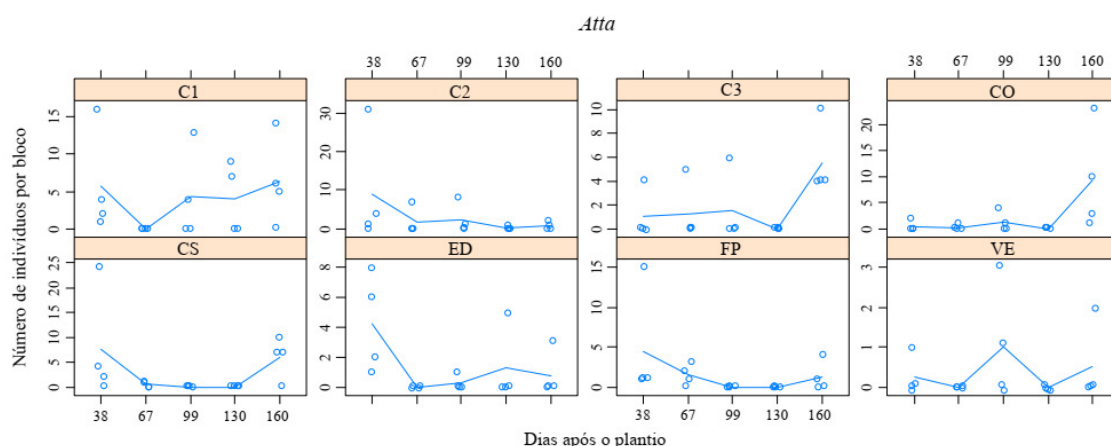


Figura 31. Número de indivíduos de *Atta* coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

O sexto gênero em abundância foi *Dorymyrmex*, que foi comum em áreas abertas e com operárias que se movimentam rapidamente em busca de presas, que podem incluir formigas aladas de outras espécies (Figura 32). Elas ainda apresentam capacidade de forragear nas horas mais quentes do dia, escapando da competição com outras espécies, e podem apresentar o hábito de ordenhar insetos sugadores (BACCARO et al., 2015; STUART; JACKSON; MCCOY, 2003). Apesar de ser considerado um grupo de formigas comum e com potencial para se tornarem dominantes em áreas perturbadas (GRAHAM et al., 2004) ele abriga também espécies raras e potencialmente ameaçadas (CUEZZO; GUERRERO, 2012).

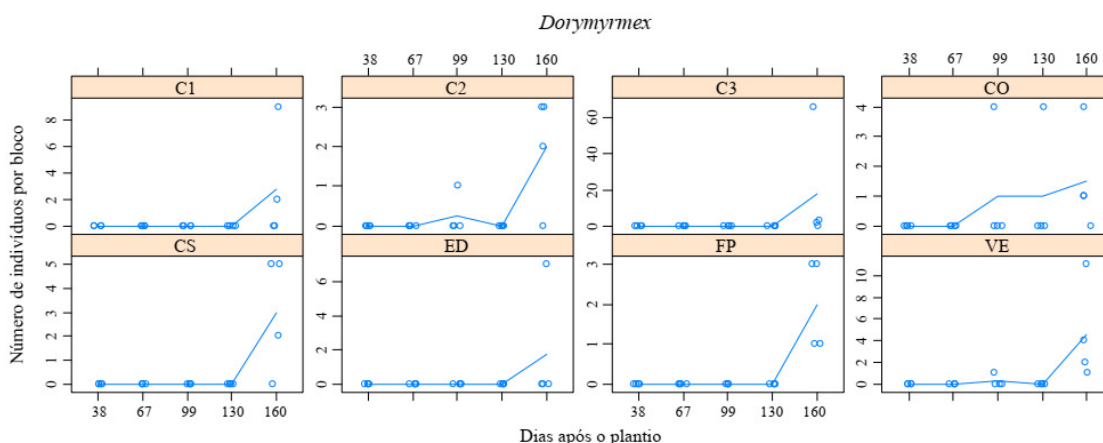


Figura 32. Número de indivíduos de *Dorymyrmex* coletados em cada bloco por tratamento (C1 – Consórcio 1, C2 – Consórcio 2, C3 – Consórcio 3, CO – Cosmos, CS – Crotalária, ED – Erva doce, FP – Feijão de Porco, VE – vegetação espontânea) nas cinco coletas representadas por dias após o plantio (38, 67, 99, 130 e 160).

Ao coletar formigas edáficas no experimento com plantas atrativas desenhado a princípio para verificar a atratividade de outros inimigos naturais, como os percevejos do gênero *Orius* (Heteroptera:Anthocoridae) e joaninhas (Coleoptera:Coccinellidae), um diferencial seria a possibilidade não apenas das formigas serem recrutadas para as parcelas com os diferentes tratamentos mas também que ocorresse o estabelecimento de novas colônias. A análise dos dados através do método da PERMANOVA não detectou diferença entre os tratamentos,

confirmou a necessidade de usar blocos casualizados e indicou efeito das coletas. Neste caso as coletas coincidem com o tempo decorrente desde a última aração, a saber 38, 67, 99, 130 e 160 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da PERMANOVA com dados das comunidades de formigas das cinco coletas.

	gl	SQ	SQM	F	R2	Pr(>F)	
BLOCO	1	0,2990	0,29904	37,859	0,02374	0,0279	*
COLETA	1	24,737	247,371	313,175	0,19638	0,0001	***
TRATAMENTO	7	0,5029	0,07184	0,9095	0,03992	0,5453	
Residuals	118	93,206	0,07899		0,73995		
Total	127	125,963			100,000		

Na primeira coleta foi registrada apenas uma amostra com uma rainha de *Wasmannia* acompanhada de seis operárias; na segunda coleta foram duas amostras com rainhas também de *Wasmannia* sendo uma com uma rainha e três operárias e uma na amostra do tratamento com 1 rainha e duas operárias. Não foi registrada nenhuma casta reprodutiva na terceira coleta. Na quarta coleta foram registradas duas rainhas de *Ectatomma* sendo uma coletada sem operárias e uma rainha com cinco operárias. Na quinta coleta o registro de castas reprodutivas teve um salto acompanhado pela ocorrência maior de formigas como um todo, incremento este prontamente perceptível na triagem e confirmado pela análise da PERMANOVA (Tabela 2) totalizando 16 amostras com castas reprodutivas sendo: oito ocorrências para *Brachymyrmex*, cinco ocorrências para *Solenopsis* e *Wasmannia* e três ocorrências para *Pheidole*. Ainda na quinta coleta foram coletados indivíduos de castas reprodutivas que foram excluídos das análises estatísticas uma vez que não foi possível determinar com precisão o gênero totalizando quatro rainhas e dois machos.

5. CONCLUSÕES

Ocorreu colonização das parcelas ao final do experimento, com o efeito significativo da coleta ($p < 0,001$), o qual deve ser imputado ao tempo decorrente desde a última aração.

Houve aumento da abundância das espécies residentes como se pode inferir nas análises gráficas.

Não houve efeito dos tratamentos. Logo, mesmo que não seja possível estabelecer um cultivo atrativo, deve se manter áreas com vegetação espontânea para a manutenção da presença de ninhos ativos na área.

A perturbação antrópica, representada no experimento pela aração na ocasião da sua implantação, tende a reduzir a abundância e a diversidade de espécies coocorrentes e favorecer formigas com capacidade de colonizar áreas perturbadas como *Wasmannia*, *Pheidole*, *Solenopsis* e *Dorymyrmex*, todas presentes nos resultados desse estudo.

Excetuando por *Atta*, que é reconhecida por seu hábito de cortar folhas e cultivar fungos, e *Labidus*, que é um grupo de formigas predadoras, todas as demais formigas registradas são predadoras generalistas e podem vir a reduzir a incidência de pragas em culturas agrícolas. Logo se não houve efeito dos tratamentos há de se recomendar que se mantenha cobertura vegetal ainda que espontânea e que estes refúgios não sejam submetidos ao revolvimento do solo se mantendo assim a mirmecofauna edáfica nos cordões de vegetação próximo aos cultivos e concomitantemente seu potencial de prover serviços ambientais.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho teve como objetivo central avaliar as alterações no solo promovidas por formigas em especial *Solenopsis invicta* seja quanto a alteração nos teores de nutrientes seja no tocante a microbiota. A intenção era se preencher lacunas e testar hipóteses que a princípio poderiam parecer insustentáveis como a ocorrência de FBN em formigas. O alvo real era gerar dados sobre os impactos na fertilidade, na movimentação de solo e na manutenção destes potenciais serviços ambientais.

Como pensar em serviços ambientais oferecidos por animais que se desconhece as suas funções em relação a fertilidade do solo? Como quantificar estes serviços diante da escassez de informações básicas? Como contribuir para sedimentar a visão de que as formigas são parte importante dos ecossistemas e consequentemente dos agroecossistemas, formigas como um todo e não somente as de interesse agrônomo no sentido estrito como as saúvas?

Agora sabemos que as formigas de fogo em um agroecossistema conduzido com orientação conservativa seguindo os preceitos da agricultura orgânica desde 1993 tendem a aumentar os teores de carbono, fósforo, potássio, silício e reduzir a acidez total dos solos. Uma grata surpresa foi a detecção de teores de silício muito mais altos nos ninhos que nas amostras de solo superficial. O silício é importante para o ciclo do carbono e o ciclo do carbono dispensa apresentações no cenário de mudanças climáticas em que estamos inseridos. A fitossanidade tende a ser globalmente beneficiada pelo aumento dos níveis de silício biodisponível, vide o aumento na produção de raízes e consequentemente o incremento na resistência ao stress hídrico.

Sabemos ainda que grande parte das bactérias associadas a *Solenopsis invicta* na SIPA são bactérias com potencial de fixação biológica de nitrogênio e/ou bactérias promotoras de crescimento. Estas associações indicam que a bioprospecção nos ninhos deste holobionte bem sucedido pode ser promissora para se encontrar por exemplo espécies de bactérias solubilizadoras de fósforo, potássio e silício. Outro gênero de bactérias presente nas amostras, *Xenorhabdus* associadas a nematóides entomopatogênicos pode ter potencial para o controle de formigas de fogo nos ambientes onde ela se encontra como espécie invasora. E mesmo que ainda não se possa afirmar com certeza absoluta, caso isto exista na ciência, há fortes indícios de que estamos diante de um caso de fixação biológica de nitrogênio decorrente de simbiose entre bactérias e um inseto, neste caso temos as primeiras evidências experimentais de ocorrência de FBN em Formicidae, para ser mais exato, nas operárias já que já se conhece FBN em jardins de fungo de *Atta* (PINTO-TOMÁS et al., 2009b). Talvez este resultado após ser confirmado experimentalmente em outros locais sirva de base para se entender o sucesso de *Solenopsis invicta* como holobionte invasor. Este é um processo natural, na busca por entender a FBN em besouros por exemplo o trabalho de MORALES-JIMÉNEZ e colaboradores (2009) depende o que foi feito 28 anos antes por BRIDGES (1981).

Dentre as 44 amostras de formigas *in vivo* submetidas ao ensaio de redução de acetileno todas apresentaram formação de etileno numa média de 23 nmol de $C_2H_4.h^{-1}$ equivalente à média de 4,3 nmol de N fixado. g (peso úmido). h^{-1} . O único registro na literatura para FBN em formigas até o presente indica uma formação de etileno de 1.03 nmol de etileno por hora por grama de peso seco, dados obtidos em jardins de fungo de *Atta* e *Acromyrmex* (PINTO-TOMÁS et al., 2009b). Ainda não havia se conseguido observar redução de acetileno *in vivo* em formigas e o presente estudo apresenta esta contribuição e não pretende esgotar o assunto, mas servir de base para estudos futuros.

O ensaio de redução de acetileno é hábil para detectar a fixação biológica de nitrogênio, tendo sido utilizado na descoberta da FBN em besouros (MORALES-JIMÉNEZ et al., 2009), cupins (BENEMANN, 1973), formigas (PINTO-TOMÁS et al., 2009b) e mosca das frutas (BEHAR; YUVAL; JURKEVITCH, 2005). Porém para se confirmar com maior exatidão a

ocorrência de FBN em *Solenopsis invicta* ao menos um de dois outros métodos considerados mais precisos deveriam ter sido empregados com sucesso seja o método do δN_{15} ou a princípio a detecção da expressão dos genes *nif*. As tentativas de amplificação de genes *nif* não detectou a expressão destes. Nota-se porém que o fato semelhante já ocorreu em outros registros de FBN em insetos como em cupins e besouros (MORALES-JIMÉNEZ et al., 2009; NODA et al., 1999). Nos cupins estudados por NODA e colaboradores (1999) a nitrogenase era codificada por *anf* produzindo um tipo alternativo de nitrogenase (*iron only nitrogenase*) que não depende do molibdênio como cofator e sim do ferro (MUS et al., 2018).

Não obstante a hipótese de que há fixação encontra sustentação em 44 amostras com sinal de redução de acetileno sendo que destas 14 amostras, que corresponde ao conjunto das que foi possível identificar as bactérias presentes, como já dito anteriormente ao longo desta tese, teve em todas elas a presença de bactérias de gêneros com espécies conhecidas por fixar dinitrogênio em situações distintas seja em vida livre, seja na rizosfera, em colmos ou ainda em nódulos.

Com cautela creio que seja possível afirmar que está ocorrendo a FBN na população de *Solenopsis invicta* existente na SIPA e se espera, que em breve, de posse dos resultados das análises da expressão dos genes *nif*, *anf* ou *vnf* se possa dirimir as dúvidas a respeito desta possibilidade de confirmar este, que seria o primeiro registro de FBN no grupo com maior biomassa entre os insetos e onipresente em todos os agroecossistemas. Como diria a Dr^a Elaine Ingham: “*So this is a frontier folks that you’re walking into, and a lot of unanswered questions have yet to be answered.*” Precisamos nos sentir confortáveis em estar nessa fronteira e para isso precisamos conviver com o desconhecido para gerar conhecimento.

Quanto aos dados do experimento de plantas atrativas poderiam desanimar os mais desavisados pois não houve resultado significativo para os tratamentos. Mas com um pouco de atenção surge a informação de que cessada a perturbação antrópica, no caso a aração, que leva a uma intensa simplificação e o decorrer de poucos meses a complexidade tende a se reestabelecer independente da cobertura vegetal utilizada inclusive com o estabelecimento de colônias. Outra informação que foi fruto de serendipidade é a massiva presença de formigas de correição que conseguem explorar as áreas cultivadas aparentemente devido a presença de vegetação remanescente nas áreas próximas ao experimento. Me refiro inclusive a vegetação espontânea crescendo ao lado de acessos e formações arbóreas esparsas dominadas por apenas uma espécie. Outra reflexão é a de que para se observar influências que podem ser sutis como a mudança na densidade de plantas atrativas consorciadas podem ser eclipsadas por uma perturbação que na escala de grão humana é irrisória, mas na escala dos organismos alvo é (permitam-me o devido exagero) o soerguimento dos Andes.

Pensando em conservação alerta para a presença de formigas de correição, um grupo de formigas edáficas essencialmente predadoras nas áreas de experimentação agrícola da Embrapa Agrobiologia necessitam de se tornar objeto de um estudo específico para o qual sugiro uma abordagem de ecologia de paisagem. A capacidade de remoção de presas, sejam outras formigas ou de imaturos de pragas agrícolas merece ser dimensionado e os meios de manter essa parte da biodiversidade preservada e prestando serviços ambientais deve ser conhecido. Inclusive para atribuir “a César o que é de César” pois uma horda de formigas de correição pode reduzir a população de insetos praga em um local onde se esteja testando experimentalmente algum controle químico ou biológico e esta ação passar despercebida ou se tornar uma barra de erro ou um desvio padrão maior do que o desejado.

Sugere-se então que estudos de controle biológico no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, que não tenham como objetivo monitorar a mirmecofauna, tenham em mente a possibilidade de interferência pela ação de *raids* de formigas de correição, as quais podem remover grande quantidade de presas em um tempo exíguo.

Especificamente em relação a *Wasmannia* que é considerada uma formiga vagabunda (*tramp ant*) e com alto potencial de se tornar uma espécie dominante os dados de presença de rainhas deste grupo na primeira e segunda coletas podem vir a embasar a hipótese de que talvez a aração seja capaz de destruir ninhos de diversas espécies de formigas mas que existe a possibilidade de que alguns ninhos de *Wasmannia* resistam ao revolvimento do solo facilitando a ampliação de suas colônias após cessada a perturbação uma vez que as demais formigas residentes tiveram seus ninhos senão aniquilados severamente destruídos. Desta maneira *Wasmannia* seria praticamente o que resta da mirmecofauna e não necessariamente o que há de melhor em termos de competição por recursos. Tendemos a sempre procurar por inimigos naturais de insetos que não desejamos, no caso das formigas procuramos forídeos, vírus e fungos. É o paradigma, é como fomos treinados a pensar. Talvez seja mais útil buscarmos identificar em quais momentos nos tornamos amigos naturais de organismos para os quais estamos buscando achar um inimigo natural.

Em linhas gerais estamos diante de diversos seres diminutos e outros mais diminutos ainda que possuem a capacidade de prestar serviços ainda não valorados, para isto basta que estes não sejam sistematicamente perturbados e que se permita seu estabelecimento e movimentação na paisagem. Espera-se então que com a divulgação dos dados aqui descritos ao se observar um ninho de formigas de fogo os agricultores e estudiosos da fertilidade dos solos com inclinação conservacionista e agroecológica passem a ver os montículos não só como algo perigoso, mas também como algo útil, como uma pequena mina liliputiana de potássio, fósforo e principalmente de silício e como um local para a com formigas repletas de microrganismos úteis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E. S. Experimental analysis of territory size in a population of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Behavioral Ecology**, v. 14, n. 1, p. 48–53, 2003.
- AGARWAL, V. M.; RASTOGI, N. Deterrent effect of a guild of extrafloral nectary-visiting ant species on *Raphidopalpa foveicollis*, a major insect pest of sponge gourd, *Luffa cylindrica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 128, n. 2, p. 303–311, 2008.
- AHLERING, M. A.; FAABORG, J. Avian Habitat Management Meets Conspecific Attraction: If You Build It, Will They Come? **The Auk**, v. 123, n. 2, p. 301, 24 jan. 2006.
- AKRAM, M. S.; SHAHID, M.; TARIQ, M.; AZEEM, M.; JAVED, M. T.; SALEEM, S.; RIAZ, S. Deciphering *Staphylococcus sciuri* SAT-17 Mediated Anti-oxidative Defense Mechanisms and Growth Modulations in Salt Stressed Maize (*Zea mays* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 867, 9 jun. 2016.
- ALBERT, R. M.; WEINER, S. Study of Phytoliths in Prehistoric Ash Layers from Kebara and Tabun Caves Using a Quantitative Approach. In: **Phytoliths: Applications in Earth Science and Human History**. Tokyo: AA Balkema Publishers, 2001. p. 251–266.
- ALEXANDRE, A.; MEUNIER, J.-D.; LEZINE, A.-M.; VINCENS, A.; SCHWARTZ, D.; ALEXANDRE, A.; L6ZINE, A.-M. Phytoliths : indicators of grassland dynamics during the late Holocene in intertropical. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 136, p. 213–229, 1997.
- ALEXANDRE, A.; MEUNIER, J.-D.; MARIOTTI, A.; SOUBIÈS, F.; SOUBIES, F. **Late Holocene phytolith and carbon-isotope record from a Latosol at Salitre, South-Central Brazil** *Quaternary Research*. [s.l.] Elsevier, 1999. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 4 set. 2020.
- ALMEIDA, F. S.; QUEIROZ, J. M.; MAYHE-NUNES, A.; MAYHÉ-NUNES, A. J. Distribuição e abundância de ninhos de *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) em um agroecossistema diversificado sob manejo orgânico. **Floresta e Ambiente**, v. 14(1), n. 1, p. 34–44, 2007.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 19–31, 1999.
- ALTIERI, M. A.; SCHMIDT, L. L. Cover crop manipulation in northern california orchards and vineyards: Effects on arthropod communities. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 3, n. 1, p. 1–24, jan. 1985.
- AMUNDSON, R.; RICHTER, D. D.; HUMPHREYS, G. S.; JOBBÁGY, E. G.; GAILLARDET, J. Coupling between biota and earth materials in the critical zone. **Elements**, v. 3, n. 5, p. 327–332, 2007.
- ANDERSON, K. E.; RUSSELL, J. A.; MOREAU, C. S.; KAUTZ, S.; SULLAM, K. E.; HU, Y.; BASINGER, U.; MOTT, B. M.; BUCK, N.; WHEELER, D. E. Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 9, p. 2282–2296, 2012.

ANDERSON, M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In: **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 1–15.

ANTWEB. **Species: Solenopsis invicta - AntWeb**. Disponível em: <<https://www.antweb.org/images.do?rank=species&genus=solenopsis&name=invicta>>. Acesso em: 16 out. 2023.

ARMBRECHT, I.; GALLEGU, M. C. Testing ant predation on the coffee berry borer in shaded and sun coffee plantations in Colombia. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 124, n. 3, p. 261–267, 2007.

ASAF, S.; NUMAN, M.; KHAN, A. L.; AL-HARRASI, A. Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 138–152, 17 fev. 2020.

BACCARO, F. B. Chave Para As Principais Subfamílias E Gêneros De Formigas (Hymenoptera: Formicidae). p. 50, 2006.

BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDES, I. O.; IZZO, T. J.; SOUZA, J. L. P.; SOLAR, R. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA, 2015.

BAGGEN, L. R.; GURR, G. M.; MEATS, A. Flowers in tri-trophic systems: Mechanisms allowing selective exploitation by insect natural enemies for conservation biological control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 91, n. 1, p. 155–161, 1999.

BAHADUR, I.; MAURYA, R.; ROY, P.; KUMAR, A. Potassium-Solubilizing Bacteria (KSB): A Microbial Tool for K-Solubility, Cycling, and Availability to Plants. In: **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 257–265.

BAR-SHMUEL, N.; BEHAR, A.; SEGOLI, M. What do we know about biological nitrogen fixation in insects? Evidence and implications for the insect and the ecosystem. **Insect Science**, v. 27, n. 3, p. 392–403, 8 jun. 2020.

BARBONI, D.; BREMOND, L.; BONNEFILLE, R. Comparative study of modern phytolith assemblages from inter-tropical Africa. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 246, n. 2–4, p. 454–470, 6 abr. 2007.

BARBOUR, E. H. Nature, structure, and phylogeny of Daemonelix. **BULLETIN OF THE GEOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA**, v. 8, n. 306–314, p. 31–39, 1897.

BARDGETT, R. D.; BOWMAN, W. D.; KAUFMANN, R.; SCHMIDT, S. K. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 11, p. 634–641, 2005.

BARDGETT, R. D.; MOMMER, L.; DE VRIES, F. T. Going underground: Root traits as drivers of ecosystem processes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 29, n. 12, p. 692–699, 2014.

BAXTER, F. P.; HOLE, F. D. Ant (Formica cinerea) Pedoturbation in a Prairie Soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 31, n. 1, p. 425, 1967.

- BEHAR, A.; YUVAL, B.; JURKEVITCH, E. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 9, p. 2637–2643, 1 ago. 2005.
- BENCKISER, G. Ants and sustainable agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n. 2, p. 191–199, 16 abr. 2010.
- BENEMANN, J. R. Nitrogen Fixation in Termites. **Science**, v. 181, n. 4095, p. 164–165, 13 jul. 1973.
- BENTLEY, B. L. Extrafloral Nectaries and Protection by Pugnacious Bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 8, n. 1, p. 407–427, 28 nov. 1977.
- BERTRAM, S. M.; BOWEN, M.; KYLE, M.; SCHADE, J. D. Extensive natural intraspecific variation in stoichiometric (C:N:P) composition in two terrestrial insect species. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 26, 27 mar. 2008.
- BIBRA, M.; KUNREDDY, V.; SANI, R. Thermostable Xylanase Production by *Geobacillus* sp. Strain DUSELR13, and Its Application in Ethanol Production with Lignocellulosic Biomass. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 93, 5 set. 2018.
- BILDSTEIN, K. L.; BLOOD, E.; FREDERICK, P. The relative importance of biotic and abiotic vectors in nutrient transport. **Estuaries**, v. 15, n. 2, p. 147–157, 1992.
- BISCHOFF, R.; SCHLÜTER, H. Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 8, p. 2275–2296, 18 abr. 2012.
- BITYUTSKII, N.; KAIDUN, P.; YAKKONEN, K. Earthworms can increase mobility and bioavailability of silicon in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 99, p. 47–53, ago. 2016.
- BLUBAUGH, C. K.; HAGLER, J. R.; MACHTLEY, S. A.; KAPLAN, I. Cover crops increase foraging activity of omnivorous predators in seed patches and facilitate weed biological control. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 231, p. 264–270, 1 set. 2016.
- BOOTS, B.; CLIPSON, N. Linking ecosystem modification by the yellow meadow ant (*Lasius flavus*) to microbial assemblages in different soil environments. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 100–106, 2013.
- BORM, S. VAN; BUSCHINGER, A.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. **Hungarian Quarterly**, v. 49, n. 191, p. 2023–2027, 2008.
- BOTTINELLI, N.; JOUQUET, P.; CAPOWIEZ, Y.; PODWOJEWSKI, P.; GRIMALDI, M.; PENG, X. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? **Soil and Tillage Research**, v. 146, n. PA, p. 118–124, 2015.
- BOUMA, J.; MONTANARELLA, L.; EVANYLO, G. The challenge for the soil science community to contribute to the implementation of the UN Sustainable Development Goals. **Soil Use and Management**, v. 35, n. 4, p. 538–546, 10 dez. 2019.
- BÖVRE, K.; HENRIKSEN, S. D. A new *Moraxella* species, *Moraxellaosloensis*, and a revised

description of *Moraxellanonliquefaciens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 127–135, 1 abr. 1967.

BRANNER, J. C. Geologic work of ants in tropical america. **BULLETIN OF THE GEOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA**, v. 21, p. 449–496, 1910.

BREMOND, L.; ALEXANDRE, A.; HÉLY, C.; GUIOT, J. A phytolith index as a proxy of tree cover density in tropical areas: Calibration with Leaf Area Index along a forest-savanna transect in southeastern Cameroon. **Global and Planetary Change**, v. 45, n. 4, p. 277–293, 1 mar. 2005.

BRIDGES, J. R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. **Microbial Ecology**, v. 7, n. 2, p. 131–137, 1981.

BRIONES, M. J. I. Soil fauna and soil functions: a jigsaw puzzle. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. April, p. 1–22, 2014.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; MA, J. F.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Beneficial Elements. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition**. Sydney: Elsevier Inc., 2011. p. 249–269.

BROWN, G. R.; MATTHEWS, I. M. A review of extensive variation in the design of pitfall traps and a proposal for a standard pitfall trap design for monitoring ground-active arthropod biodiversity. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 12, p. 3953–3964, 1 jun. 2016.

BRUCH, C. Costumbres e nidos de hormigas. **An. Soc. Cient. Argent.**, v. 84, p. 154–172, 1917.

BRUCH, C. Estudios mirmecológicos. **An. Mus. Nac. Hist. Nat. B. Aires**, v. 34, p. 341–360, lamina I- VI, 1928.

BÜNEMANN, E. K.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R. E.; DE DEYN, G.; DE GOEDE, R.; FLESKENS, L.; GEISSEN, V.; KUYPER, T. W.; MÄDER, P.; PULLEMAN, M.; SUKKEL, W.; VAN GROENIGEN, J. W.; BRUSSAARD, L. **Soil quality – A critical review** **Soil Biology and Biochemistry** Elsevier Ltd, , 1 maio 2018.

BURDMAN, S.; WALCOTT, R. R. **Plant-pathogenic Acidovorax species**. [s.l.] American Phytopathological Society (APS Press), 2018.

BUTLER, D. R. **Zoogeomorphology : animals as geomorphic agents**. [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

CALEGARI, M. R.; MADELLA, M.; VIDAL-TORRADO, P.; OTERO, X. L.; MACIAS, F.; OSTERRIETH, M. Opal phytolith extraction in oxisols. **Quaternary International**, v. 287, p. 56–62, 2013.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, 1 dez. 2017.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.

Nature Methods, v. 13, n. 7, p. 581–583, 29 jun. 2016.

CAMARGO, M. S. DE; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 637–647, 2007.

CANI, P. D.; DE VOS, W. M. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1765, 22 set. 2017.

CARROLL, C. R.; JANZEN, D. H. Ecology of foraging by ants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 1973.

CARTER, M. R.; GREGORICH, E. G.; ANDERSON, D. W.; DORAN, J. W.; JANZEN, H. H.; PIERCE, F. J. **Chapter 1 Concepts of soil quality and their significance** *Developments in Soil Science* Elsevier, , 1 jan. 1997.

CASSILL, D. L.; TSCHINKEL, W. R. Regulation of diet in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Behavior**, v. 12, n. 3, p. 307–328, 1999.

CAUGANT, D. A.; BRYNILDSRUD, O. B. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 84–96, 1 fev. 2020.

CHAPARRO, J. M.; SHEFLIN, A. M.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.

CHAUDHARY, H. J.; PENG, G.; HU, M.; HE, Y.; YANG, L.; LUO, Y.; TAN, Z. Genetic Diversity of Endophytic Diazotrophs of the Wild Rice, *Oryza alta* and Identification of the New Diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 4, p. 813–821, 2012.

CHHETRI, G.; KIM, I.; KANG, M.; SO, Y.; KIM, J.; SEO, T. **An Isolated Arthrobacter sp. Enhances Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Growth** *Microorganisms*, 2022.

CHUST, G.; PRETUS, J. L.; DUCROT, D.; BEDÒS, A.; DEHARVENG, L. Identification of landscape units from an insect perspective. **Ecography**, v. 26, n. August 2002, p. 257–268, 2003.

CLAY, N. A.; LUCAS, J.; KASPARI, M.; KAY, A. D. Manna from heaven: Refuse from an arboreal ant links aboveground and belowground processes in a lowland tropical forest. **Ecosphere**, v. 4, n. 11, p. Article 141, 2013.

COCK, M. J. W.; BIESMEIJER, J. C.; CANNON, R. J. C.; GERARD, P. J.; GILLESPIE, D.; JIMENEZ, J. J.; LAVELLE, P. M.; RAINA, S. K. The positive contribution of invertebrates to sustainable agriculture and food security. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 7, n. 043, p. 1–27, 2012.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633, 1 jan. 2014.

COLEMAN, D. C.; ZHANG, W.; FU, S. Toward a Holistic Approach to Soils and Plant

Growth. In: **Interactions in soil: promoting plant growth**. [s.l.] Springer, Dordrecht, 2014. p. 211–223.

COMPTON, S. **Collecting Fire Ants for Biocontrol Program** YouTube, , 6 abr. 2016. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=MoD_kBrNdXI>. Acesso em: 10 set. 2020

CONLEY, D. J. Terrestrial ecosystems and the global biogeochemical silica cycle. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 4, p. 68-1-68–8, dez. 2002.

CRONIN, T. W.; SHASHAR, N.; CALDWELL, R. L.; MARSHALL, J.; CHEROSKE, A. G.; CHIOU, T.-H. Polarization vision and its role in biological signaling. **Integrative and comparative biology**, v. 43, n. 4, p. 549–558, 2003.

CUEZZO, F.; GUERRERO, R. J. The ant genus *Dorymyrmex* Mayr (Hymenoptera: Formicidae: Dolichoderinae) in Colombia. **Psyche (London)**, v. 2012, p. 24, 2012.

CURTIS, A. D.; WALLER, D. A. The effects of decreased pO₂ and increased pCO₂ on nitrogen fixation rates in termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 42, n. 9, p. 867–872, 1996.

CZACZKES, T. J.; GRÜTER, C.; RATNIEKS, F. L. W. Trail Pheromones, An integrative view of their role in social insect colony organization. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 581–599, 2015.

CZACZKES, T. J.; HEINZE, J.; RUTHER, J. Nest etiquette-where ants go when nature calls. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

DAHAL, B.; NANDAKAFLE, G.; PERKINS, L.; BRÖZEL, V. S. Diversity of free-Living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. **Microbiological Research**, v. 195, p. 31–39, 1 jan. 2017.

DARDANELLI, M. S.; MANYANI, H.; GONZÁLEZ-BARROSO, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; GIL-SERRANO, A. M.; ESPUNY, M. R.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; BELLOGÍN, R. A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. **Plant and Soil**, v. 328, n. 1, p. 483–493, 8 fev. 2010.

DARWIN, C. R. **The Formation of the Vegetable Mould Through the Action of Worms**. London: John Murray, 1881.

DASSOU, A. G.; TIXIER, P. Response of pest control by generalist predators to local-scale plant diversity: A meta-analysis. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 4, p. 1143–1153, 2016.

DAUSSIN, A.; VANNIER, P.; MÉNAGER, M.; DABOUSSY, L.; ŠANTL-TEMKIV, T.; COCKELL, C.; MARTEINSSON, V. Þ. Comparison of Atmospheric and Lithospheric Culturable Bacterial Communities from Two Dissimilar Active Volcanic Sites, Surtsey Island and Fimmvörðuháls Mountain in Iceland. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 665, 1 mar. 2023.

DAVIDSON, D. W.; PATRELL-KIM, L. Tropical arboreal ants: Why so abundant? **Neotropical biodiversity and conservation**, n. January 1996, p. 127–140, 1996.

- DE BONT, J. A. M.; MULDER, E. G. Invalidity of the acetylene reduction assay in alkane utilizing, nitrogen fixing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 640–647, 1976.
- DE VEGA, C.; HERRERA, C. M. Microorganisms transported by ants induce changes in floral nectar composition of an ant-pollinated plant. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 4, p. 792–800, 2013.
- DEFAUW, S. L.; VOGT, J. T.; BOYKIN, D. L. Influence of mound construction by red and hybrid imported fire ants on soil chemical properties and turfgrass in a sod production agroecosystem. **Insectes Sociaux**, v. 55, n. 3, p. 301–312, 2008.
- DEL TORO, I.; RIBBONS, R. R.; PELINI, S. L. The little things that run the world revisited: A review of ant-mediated ecosystem services and disservices (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 17, n. August, p. 133–146, 2012.
- DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ARAÚJO, J. L. S.; ROUWS, L. F. M.; ZILLI, J. É.; PARMA, M. M.; MELO, I. S.; HUNGRIA, M. Bradyrhizobium stylosanthis sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume Stylosanthes spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3078–3087, 1 ago. 2016.
- DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 127, n. 2, p. 285–294, out. 1966.
- DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 1 dez. 2003.
- DIXON, R. A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C. J.; REDDY, M. S. S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 5, p. 371–390, 2002.
- DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 3–11, 2000.
- DORN, R. I. Ants as a powerful biotic agent of olivine and plagioclase dissolution. **Geology**, v. 42, n. 9, p. 771–774, 2014.
- DURAN-FLORES, D.; HEIL, M. Damaged-self recognition in common bean (Phaseolus vulgaris) shows taxonomic specificity and triggers signaling via reactive oxygen species (ROS). **Frontiers in plant science**, v. 5, n. October, p. 585, 2014.
- EHRLICH, H. L. How microbes influence mineral growth and dissolution. **Chemical Geology**, v. 132, n. 1–4, p. 5–9, out. 1996.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, n. 4, p. 387–400, 2001.
- EL-HAMALAWI, Z. A.; MENGE, J. A. The role of snails and ants in transmitting the avocado stem canker pathogen, Phytophthora citricola. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 5, p. 973–977, 1996.

ELLWOOD, M. D. F.; FOSTER, W. A. Doubling the estimate of invertebrate biomass in a rainforest canopy. **Nature**, v. 429, n. 6991, p. 549–551, 2004.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 50, n. 50, p. 641–664, 28 jun. 1999.

EUBANKS, M. D. Estimates of the Direct and Indirect Effects of Red Imported Fire Ants on Biological Control in Field Crops. **Biological Control**, v. 21, n. 1, p. 35–43, 2001.

EVANS, T. A.; DAWES, T. Z.; WARD, P. R.; LO, N. Ants and termites increase crop yield in a dry climate. **Nature Communications**, v. 2, n. August 2015, p. 262, 2011.

FARJI-BRENER, A. G.; WERENKRAUT, V. The effects of ant nests on soil fertility and plant performance: a meta-analysis. **Journal of Animal Ecology**, v. 86, n. 4, p. 866–877, 2017.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 5, p. 533–543, 1 out. 2011.

FERNANDEZ, A.; FARJI-BRENER, A. G.; SATTI, P. Moisture enhances the positive effect of leaf-cutting ant refuse dumps on soil biota activity. **Austral Ecology**, v. 39, n. 2, p. 198–203, 2014.

FITTKAU, E. J.; KLINGE, H. On Biomass and Trophic Structure of the Central Amazonian Rain Forest Ecosystem. **Biotropica**, v. 5, n. 1, p. 2, abr. 1973.

FOUCAUD, J.; ORIVEL, J.; FOURNIER, D.; DELABIE, J. H. C.; LOISEAU, A.; LE BRETON, J.; CERDAN, P.; ESTOUP, A. Reproductive system, social organization, human disturbance and ecological dominance in native populations of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 24, p. 5059–5073, 1 dez. 2009.

FOUCAUD, J.; ORIVEL, J.; LOISEAU, A.; DELABIE, J. H. C.; JOURDAN, H.; KONGHOULEUX, D.; VONSHAK, M.; TINDO, M.; MERCIER, J. L.; FRESNEAU, D.; MIKISSA, J. B.; MCGLYNN, T.; MIKHEYEV, A. S.; OETTLER, J.; ESTOUP, A. Worldwide invasion by the little fire ant: Routes of introduction and eco-evolutionary pathways. **Evolutionary Applications**, v. 3, n. 4, p. 363–374, 2010.

FOWLER, H. G.; BUENO, O. C.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; BERNDT, K.-P.; EICHLER, W.; CZAJKOWSKA, M.; EDWARDS, J. P.; BAKER, L. F.; SY, M. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of sao paulo, brazil. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 14, n. 03, p. 367–370, 19 jun. 1993.

FOX, A. F.; KIM, T. N.; BAHLAI, C. A.; WOLTZ, J. M.; GRATTON, C.; LANDIS, D. A. Cover crops have neutral effects on predator communities and biological control services in annual cellulosic bioenergy cropping systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 232, p. 101–109, set. 2016a.

FOX, A. R.; SOTO, G.; VALVERDE, C.; RUSSO, D.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, Á.; ALLEVA, K.; PASCUAN, C.; FRARE, R.; MERCADO-BLANCO, J.; DIXON, R.; AYUB, N. D. Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 3522–3534, 1 out. 2016b.

- FROUZ, J.; JILKOVÁ, V. The effect of ants on soil properties and processes (Hymenoptera : Formicidae). **Myrmecological News**, v. 11, n. August, p. 191–199, 2008.
- FROUZ, J.; KALČÍK, J.; CUDLÍN, P. Accumulation of phosphorus in nests of red wood ants *Formica* s. str. **Annales Zoologici Fennici**, v. 42, n. 3, p. 269–275, 2005.
- FROUZ, J.; ŠANTRŮČKOVÁ, H.; KALČÍK, J. The effect of wood ants (*Formica polyctena* Foerst.) on the transformation of phosphorus in a spruce plantation. **Pedobiologia**, v. 41, n. 5, p. 437–447, 1997.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2018.
- GABA, S.; LESCOURRET, F.; BOUDSOCQ, S.; ENJALBERT, J.; HINSINGER, P.; JOURNET, E. P.; NAVAS, M. L.; WERY, J.; LOUARN, G.; MALÉZIEUX, E.; PELZER, E.; PRUDENT, M.; OZIER-LAFONTAINE, H. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 607–623, 2015.
- GABET, E. J.; REICHMAN, O. J.; SEABLOOM, E. W. THE EFFECTS OF BIOTURBATION ON SOIL PROCESSES AND SEDIMENT TRANSPORT. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 31, n. 1, p. 249–273, 2003.
- GADAU, J. DNA isolation from ants. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 7, p. pdb.prot5245-pdb.prot5245, 1 jul. 2009.
- GAST, R. K.; PORTER, R. E. Salmonella Infections. In: **Diseases of Poultry**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 717–753.
- GIGLIOLI, I. Insects and Yeasts. **Nature**, v. 56, n. 1459, p. 575–577, 1897.
- GLIESSMAN, S. Agroecology: Growing the roots of resistance. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 37, n. 1, p. 19–31, 2013.
- GOLYEVA, A. Biomorphic analysis as a part of soil morphological investigations. **Catena**, v. 43, n. 3, p. 217–230, abr. 2001.
- GONTHIER, D. J.; ENNIS, K. K.; PHILPOTT, S. M.; VANDERMEER, J.; PERFECTO, I. Ants defend coffee from berry borer colonization. **BioControl**, v. 58, n. 6, p. 815–820, 2013.
- GRAHAM, J. H.; HUGHIE, H. H.; JONES, S.; WRINN, K.; KRZYSIK, A. J.; DUDA, J. J.; FREEMAN, D. C.; EMLIN, J. M.; ZAK, J. C.; KOVACIC, D. A.; CHAMBERLIN-GRAHAM, C.; BALBACH, H. Habitat disturbance and the diversity and abundance of ants (Formicidae) in the Southeastern Fall-Line Sandhills. **Journal of Insect Science (Online)**, v. 4, p. 30, 2004.
- GTARI, M.; GHODHBANE-GTARI, F.; NOUIOUI, I.; BEAUCHEMIN, N.; TISA, L. S. Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 1, p. 3–11, 2012.
- GULCU, B.; RAJA, K.; HAZIR, S. Entomopathogenic Nematodes and their Mutualistic Bacteria: Their Ecology and Application as Microbial Control Agents. **Biopesticides International**, v. 13, n. 2, p. 79–112, 2017.

GUNTZER, F.; KELLER, C.; MEUNIER, J. D. Benefits of plant silicon for crops: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 201–213, 2012.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4742–6, 2009.

HALFEN, A. F.; HASIOTIS, S. T. Neoichnological Study of the Traces and Burrowing Behaviors of the Western Harvester Ant *Pogonomyrmex Occidentalis* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae): Paleopedogenic and Paleoecological Implications. **Palaos**, v. 25, n. 11, p. 703–720, 2010.

HALLMANN, C. A.; SORG, M.; JONGEJANS, E.; SIEPEL, H.; HOFLAND, N.; SCHWAN, H.; STENMANS, W.; MÜLLER, A.; SUMSER, H.; HÖRREN, T.; GOULSON, D.; DE KROON, H. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0185809, 18 out. 2017.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The Acetylene - Ethylene Assay for N₂ Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

HARVEY, A. W. Extrafloral Nectaries in Kudzu, *Pueraria montana* (Lour.) Merr., and Groundnut, *Apios americana* Medicus (Fabaceae). **Castanea**, v. 74, n. 4, p. 360–371, 2009.

HASIOTIS, S. T.; HALFEN, A. F. The Story of O : The Dominance of Organisms as a Soil-Forming Factor From an Integrated Geologic Perspective and Modern Field and Experimental Studies. **World congress of soil science**, n. August, p. 100–103, 2010.

HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles: Targets, perception and unanswered questions. **Journal of Physiology**, v. 204, n. 2, p. 297–306, 2014.

HEIL, M.; MCKEY, D. Protective Ant-Plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 425–553, nov. 2003.

HEIL, M.; SILVA BUENO, J. C. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 13, p. 5467–5472, 2007.

HIGDON, S. M.; POZZO, T.; KONG, N.; HUANG, B.; YANG, M. L.; JEANNOTTE, R.; BROWN, C. T.; BENNETT, A. B.; WEIMER, B. C. Genomic characterization of a diazotrophic microbiota associated with maize aerial root mucilage. **bioRxiv**, p. 2020.04.27.064337, 29 abr. 2020.

HILDEBRAND, C. Manual de métodos de análise químicas de solo e plantas. **Curitiba: Universidade Federal do Paraná**, p. 225, 1976.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041–4062, 23 abr. 2014.

- HOLE, F. D. Effects of animals on soil. **Geoderma**, v. 25, n. 1981, p. 75–112, 1981.
- HOLEC, M.; FROUZ, J. The effect of two ant species *Lasius niger* and *Lasius flavus* on soil properties in two contrasting habitats. v. 42, p. 213–217, 2006.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. **The ants**. Cambridge: Belknap Press, 1990.
- HOLWAY, D. A.; SUAREZ, A. V. Homogenization of ant communities in mediterranean California: The effects of urbanization and invasion. **Biological Conservation**, v. 127, n. 3, p. 319–326, 2006.
- HOOPER, D. U.; CHAPIN, F. S.; EWEL, J. J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON, J. H.; LODGE, D. M.; LOREAU, M.; NAEEM, S.; SCHMID, B.; SETÄLÄ, H.; SYMSTAD, A. J.; VANDERMEER, J.; WARDLE, D. A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. **Ecological Monographs**, v. 75, n. 1, p. 3–35, 2005.
- HORTON, D. R.; JONES, V. P.; UNRUH, T. R. Use of a new immunomarking method to assess movement by generalist predators between a cover crop and a tree canopy in a pear orchard. **American Entomologist**, v. 55, n. 1, p. 49–56, 2009.
- HOWARTH, F. G. Environmental Impacts of Classical Biological Control. **Annual Review of Entomology**, v. 36, n. 1, p. 485–509, 1 jan. 1991.
- HU, G.; LIM, K. S.; HORVITZ, N.; CLARK, S. J.; REYNOLDS, D. R.; SAPIR, N.; CHAPMAN, J. W. Mass seasonal bioflows of high-flying insect migrants. **Science**, v. 354, n. 6319, p. 1584–1587, 23 dez. 2016.
- HU, L.; XIA, M.; LIN, X.; XU, C.; LI, W.; WANG, J.; ZENG, R.; SONG, Y. Earthworm gut bacteria increase silicon bioavailability and acquisition by maize. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 125, p. 215–221, out. 2018a.
- HU, Y.; HOLWAY, D. A.; ŁUKASIK, P.; CHAU, L.; KAY, A. D.; LEBRUN, E. G.; MILLER, K. A.; SANDERS, J. G.; SUAREZ, A. V.; RUSSELL, J. A. By their own devices: invasive Argentine ants have shifted diet without clear aid from symbiotic microbes. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1608–1630, 2017.
- HU, Y.; ŁUKASIK, P.; MOREAU, C. S.; RUSSELL, J. A. Correlates of gut community composition across an ant species (*Cephalotes varians*) elucidate causes and consequences of symbiotic variability. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1284–1300, 2014.
- HU, Y.; SANDERS, J. G.; ŁUKASIK, P.; D'AMELIO, C. L.; MILLAR, J. S.; VANN, D. R.; LAN, Y.; NEWTON, J. A.; SCHOTANUS, M.; KRONAUER, D. J. C.; PIERCE, N. E.; MOREAU, C. S.; WERTZ, J. T.; ENGEL, P.; RUSSELL, J. A. Herbivorous turtle ants obtain essential nutrients from a conserved nitrogen-recycling gut microbiome. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018b.
- HUANG, H.; REN, L.; LI, H.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J.; LU, Y.; CHENG, D. The nesting preference of an invasive ant is associated with the cues produced by actinobacteria in soil. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 9, p. e1008800, 10 set. 2020.
- HUANG, J.; SHENG, X. F.; XI, J.; HE, L. Y.; HUANG, Z.; WANG, Q.; ZHANG, Z. D. Depth-

related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 29–42, 2014.

HUDA, N. U.; TANVIR, R.; BADAR, J.; ALI, I.; REHMAN, Y. **Arsenic-Resistant Plant Growth Promoting Pseudoxanthomonas mexicana S254 and Stenotrophomonas maltophilia S255 Isolated from Agriculture Soil Contaminated by Industrial Effluent** Sustainability, 2022.

HUGGETT, R. J. **Geocology: An evolutionary approach**. [s.l: s.n.]. v. 11

HUGH-JONES, M.; BLACKBURN, J. The ecology of Bacillus anthracis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 6, p. 356–367, 2009.

ISELL, F.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; LOREAU, M. The biodiversity-dependent ecosystem service debt. **Ecology Letters**, v. 18, n. 2, p. 119–134, 2015.

ISHAK, H. D.; MILLER, J. L.; SEN, R.; DOWD, S. E.; MEYER, E.; MUELLER, U. G. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant Trachymyrmex septentrionalis. **Scientific Reports**, v. 1, p. 20–22, 2011a.

ISHAK, H. D.; PLOWES, R.; SEN, R.; KELLNER, K.; MEYER, E.; ESTRADA, D. A.; DOWD, S. E.; MUELLER, U. G. Bacterial Diversity in Solenopsis invicta and Solenopsis geminata Ant Colonies Characterized by 16S amplicon 454 Pyrosequencing. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 4, p. 821–831, 2011b.

JACKSON, T. A. Weathering, secondary mineral genesis, and soil formation caused by lichens and mosses growing on granitic gneiss in a boreal forest environment. **Geoderma**, v. 251–252, n. August, p. 78–91, 2015.

JIANG, Z.; TUO, L.; HUANG, D.; OSTERMAN, I. A.; TYURIN, A. P.; LIU, S.; LUKYANOV, D. A.; SERGIEV, P. V.; DONTSOVA, O. A.; KORSHUN, V. A.; LI, F.; SUN, C. Diversity, Novelty, and Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria From Mangrove Plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 868, 4 maio 2018.

JOHANSSON, H.; DHAYGUDE, K.; LINDSTRÖM, S.; HELANTERÄ, H.; SUNDSTRÖM, L.; TRONTTI, K. A metatranscriptomic approach to the identification of microbiota associated with the ant Formica exsecta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

JOHNSON, D. L. Biomantle evolution and the redistribution of earth materials and artifacts. **Soil Science**, v. 149, n. 2, p. 84–102, 1990.

JOHNSON, D. L.; JOHNSON, D. N.; HACKLEY, K. C.; CAHILL, R. A. **Mima mounds as upper soil biomantles: What happens when the dominant bioturbators leave and invertebrates take over?** 18th World Congress of Soil Science July 9-15, 2006 - Philadelphia, Pennsylvania, USA. **Anais...**2006

JOHNSON, D. L.; WATSON-STEGNER, D. Evolution model of pedogenesis. **Soil Science**, v. 143, n. 5, p. 349–366, 1987.

JONES, C. G. Ecosystem engineers and geomorphological signatures in landscapes.

Geomorphology, v. 157–158, p. 75–87, 2012.

JONES, C. G.; LAWRON, J. H.; SHACHAK, M. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. **Ecology**, v. 78, n. 7, p. 1946–1957, 1997.

JONES, L. H. P.; HANDRECK, K. A. Silica In Soils, Plants, and Animals. **Advances in Agronomy**, v. 19, n. C, p. 107–149, 1967.

JOUQUET, P.; DAUBER, J.; LAGERLÖF, J.; LAVELLE, P.; LEPAGE, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 153–164, 2006.

JOUQUET, P.; JAMOTEAU, F.; MAJUMDAR, S.; PODWOJEWSKI, P.; NAGABOVANALLI, P.; CANER, L.; BARBONI, D.; MEUNIER, J. D. The distribution of Silicon in soil is influenced by termite bioturbation in South Indian forest soils. **Geoderma**, v. 372, p. 114362, 1 ago. 2020.

JOURDAN, H. Threats on Pacific islands: The spread of the Tramp Ant *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). **Pacific Conservation Biology**, v. 3, n. 1, p. 61–64, 1997.

KASAI, H. *Smaragdicoccus*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–4.

KASPARI, M.; O'DONNELL, S. High rates of army ant raids in the Neotropics and implications for ant colony and community structure. **Evolutionary Ecology Research**, v. 5, n. 6, p. 933–939, 2003.

KASPARI, M.; POWELL, S.; LATTKKE, J.; O'DONNELL, S. Predation and patchiness in the tropical litter: Do swarm-raiding army ants skim the cream or drain the bottle? **Journal of Animal Ecology**, v. 80, n. 4, p. 818–823, 2011.

KASPARI, M.; WEISER, M. The size-grain hypothesis: Do macroarthropods see a fractal world? **Ecological Entomology**, v. 32, n. 3, p. 279–282, 2007.

KASPARI, M.; WEISER, M. D. Kaspari and Weiser 2000- Ant Activity along Moisture Gradients in a Neotropical Forest.pdf. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 703–711, 2000.

KATAYAMA, N.; SUZUKI, N. Role of extrafloral nectaries of *Vicia faba* in attraction of ants and herbivore exclusion by ants. **Entomological Science**, v. 7, n. 2, p. 119–124, jun. 2004.

KAUTZ, S.; RUBIN, B. E. R.; RUSSELL, J. A.; MOREAUA, C. S. Surveying the microbiome of ants: Comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 525–534, 2013.

KAYASTH, M.; KUMAR, V.; GERA, R. *Gordonia* sp.: a salt tolerant bacterial inoculant for growth promotion of pearl millet under saline soil conditions. **3 Biotech**, v. 4, n. 5, p. 553–557, 2 out. 2014.

KELLNER, K.; ISHAK, H. D.; LINKSVAYER, T. A.; MUELLER, U. G. Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 7, 2015.

KING, J. R. Where do eusocial insects fit into soil food webs? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 102, p. 55–62, 2016.

KING, J. R.; TSCHINKEL, W. R. Experimental evidence that human impacts drive fire ant invasions and ecological change. **PNAS**, v. 105, n. 51, p. 20339–20343, 23 dez. 2008.

KIRKBY, E. Introduction, Definition and Classification of Nutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011. p. 3–5.

KRONAUER, D. J. C. Recent advances in army ant biology (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 12, n. September, p. 51–65, 2009.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 24 mar. 2016.

KUMAR, A.; O'DONNELL, S. Elevation and forest clearing effects on foraging differ between surface - and subterranean - foraging army ants (Formicidae: Ecitoninae). **Journal of Animal Ecology**, v. 78, n. 1, p. 91–97, 2009.

KWON, T.-S.; LEE, C.; SUNG, J. Diversity decrease of ant (Formicidae, Hymenoptera) after a forest disturbance: different responses among functional guilds. **Zoological Studies**, v. 53, n. 1, p. 37, 2014.

LACH, L.; PARR, C.; ABBOTT, K. (EDS.). **Ant ecology**. New York: Oxford University Press, 2010.

LAL, R. Soil health and carbon management. **Food and Energy Security**, v. 5, n. 4, p. 212–222, 2016.

LAL, R. Managing soils for resolving the conflict between agriculture and nature: The hard talk. **European Journal of Soil Science**, v. 71, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2020.

LAU, S. K. P.; CHOW, W. N.; FOO, C. H.; CURREEM, S. O. T.; LO, G. C. S.; TENG, J. L. L.; CHEN, J. H. K.; NG, R. H. Y.; WU, A. K. L.; CHEUNG, I. Y. Y.; CHAU, S. K. Y.; LUNG, D. C.; LEE, R. A.; TSE, C. W. S.; FUNG, K. S. C.; QUE, T. L.; WOO, P. C. Y. *Elizabethkingia anophelis* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 17 maio 2016.

LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; MARTIN, A.; SPAIN, A. V.; MARTIN, S. Impact of Soil Fauna on the properties of Soils in the Humid Tropics. **Myths and Science of Soils of the Tropics. SSSA Special Publication**, n. 29, p. 29, 1992.

LEÓN, A.; DEL-ÁNGEL, M.; ÁVILA, J. L.; DELGADO, G. Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity BT - Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. In: KINGHORN, A. D.; FALK, H.; GIBBONS, S.; KOBAYASHI, J. (Eds.). Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 127–246.

LERSTEN, N. R.; BRUBAKER, C. L. Extrafloral Nectaries in Leguminosae: Review and Original Observations in Erythrina and Mucuna (Papilionoideae; Phaseoleae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 114, n. 4, p. 437, out. 1987.

- LESLIE, A. W.; WANG, K. H.; MEYER, S. L. F.; MARAHATTA, S.; HOOKS, C. R. R. Influence of cover crops on arthropods, free-living nematodes, and yield in a succeeding no-till soybean crop. **Applied Soil Ecology**, v. 117–118, p. 21–31, set. 2017.
- LEVINGS, S. C.; FRANKS, N. R. Patterns of Nested Dispersion in a Tropical Ground Ant Community. **Ecology**, v. 63, n. 2, p. 338–344, 1982.
- LI, D.; ROTHBALLER, M.; ENGEL, M.; HOSER, J.; SCHMIDT, T.; KUTTLER, C.; SCHMID, M.; SCHLOTER, M.; HARTMANN, A. Phenotypic variation in *Acidovorax radici* N35 influences plant growth promotion. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 751–762, 1 mar. 2012.
- LI, Y.; GUO, L.; HÄGGBLÖM, M. M.; YANG, R.; LI, M.; SUN, X.; CHEN, Z.; LI, F.; SU, X.; YAN, G.; XIAO, E.; ZHANG, H.; SUN, W. *Serratia* spp. Are Responsible for Nitrogen Fixation Fueled by As(III) Oxidation, a Novel Biogeochemical Process Identified in Mine Tailings. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 3, p. 2033–2043, 1 fev. 2022.
- LIANG, Y.; NIKOLIC, M.; BÉLANGER, R.; GONG, H.; SONG, A. Silicon in agriculture: From theory to practice. **Silicon in Agriculture: From Theory to Practice**, p. 1–235, 2015a.
- LIANG, Y.; NIKOLIC, M.; BÉLANGER, R.; GONG, H.; SONG, A.; LIANG, Y.; NIKOLIC, M.; BÉLANGER, R.; GONG, H.; SONG, A. Silicon and Insect Pest Resistance. In: **Silicon in Agriculture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015b. p. 197–207.
- LOBO, D.; TABARELLI, M.; LEAL, I. R. Relocation of *Croton sonderianus* (Euphorbiaceae) Seeds by *Pheidole fallax* Mayr (Formicidae): a Case of Post-Dispersal Seed Protection by Ants? **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2006, p. 440–444, 2011.
- LOBRY DE BRUYN, L. A. Ants as bioindicators of soil function in rural environments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 425–441, 1999.
- LOFFLER, E.; MARGULES, C. Wombats *Lasiorhinus latifrons* detected from space. **Remote Sensing of Environment**, v. 9, p. 47–56, 1980.
- LUBCHENCO, J.; BARNER, A. K.; CERNY-CHIPMAN, E. B.; REIMER, J. N. Sustainability rooted in science. **Nature**, v. 8, n. 10, p. 741–745, 2015.
- LYFORD, W. H. **Importance of ants to brown podzolic soil genesis in New England**. Cambridge: Harvard University Press, 1963.
- MA, F. M.; TAKAHASHI, A. **Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2002.
- MAHESHWARI, D. K.; DHEEMAN, S.; AGARWAL, M. Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture. In: [s.l.] Springer, Cham, 2015. p. 159–182.
- MAJER, J. D. The use of pitfall traps for sampling ants – a critique. **Memoirs of the Museum of Victoria**, v. 56, n. 2, p. 323–329, 1997.
- MANNA, M.; PARK, I.; SEO, Y.-S. Genomic Features and Insights into the Taxonomy, Virulence, and Benevolence of Plant-Associated *Burkholderia* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 121, 29 dez. 2018.

MANNING, D. A. C. Mineral sources of potassium for plant nutrition. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n. 2, p. 281–294, 2010.

MARICHAL, R.; GRIMALDI, M.; FEJOO, M. A.; OSZWALD, J.; PRAXEDES, C.; RUIZ COBO, D. H.; DEL PILAR HURTADO, M.; DESJARDINS, T.; DA SILVA JUNIOR, M. L.; DA SILVA COSTA, L. G.; MIRANDA, I. S.; DELGADO OLIVEIRA, M. N.; BROWN, G. G.; TSÉLOUIKO, S.; MARTINS, M. B.; DECAËNS, T.; VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P. Soil macroinvertebrate communities and ecosystem services in deforested landscapes of Amazonia. **Applied Soil Ecology**, v. 83, n. June, p. 177–185, 2014.

MARÍN, L.; JACKSON, D.; PERFECTO, I. A positive association between ants and spiders and potential mechanisms driving the pattern. **Oikos**, v. 124, n. 8, p. 1078–1088, 2015.

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

MASSEY, F. P.; ENNOS, A. R.; HARTLEY, S. E. Silica in grasses as a defence against insect herbivores: Contrasting effects on folivores and a phloem feeder. **Journal of Animal Ecology**, v. 75, n. 2, p. 595–603, 31 mar. 2006.

MASSEY, F. P.; HARTLEY, S. E. Physical defences wear you down: Progressive and irreversible impacts of silica on insect herbivores. **Journal of Animal Ecology**, v. 78, n. 1, p. 281–291, 1 jan. 2009.

MCDONALD, D. L. **Investigation of an invasive ant species: Nylanderia fulva. Colony extration, management, diet preference, fecundity and mechanical vector potential**. [s.l.] TEXAS A&M, 2012.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MCNATTY, A.; ABBOTT, K. L.; LESTER, P. J. Invasive ants compete with and modify the trophic ecology of hermit crabs on tropical islands. **Oecologia**, v. 160, n. 1, p. 187–194, 2009.

MCNEILL, A.; UNKOVICH, M. The Nitrogen Cycle in Terrestrial Ecosystems. In: **Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 37–64.

MEHRA, O. P.; JACKSON, M. L. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. **Proceedings 7th nat. Conf. Clays**, v. 5, p. 317–327, 1960.

MEYSMAN, F. J. R.; MIDDELBURG, J. J.; HEIP, C. H. R. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 12, p. 688–695, 2006.

MIDEGA, C. A. O.; KHAN, Z. R.; VAN DEN BERG, J.; OGOL, C. K. P. O.; BRUCE, T. J.; PICKETT, J. A. Non-target effects of the “push-pull” habitat management strategy: Parasitoid activity and soil fauna abundance. **Crop Protection**, v. 28, n. 12, p. 1045–1051, 2009.

MIDEGA, C. A. O.; KHAN, Z. R.; VAN DEN BERG, J.; OGOL, C. K. P. O.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A. S.; PICKETT, J. A.; WADHAMS, L. J. Response of ground-dwelling arthropods to a “push-pull” habitat management system: Spiders as an indicator group. **Journal**

of **Applied Entomology**, v. 132, n. 3, p. 248–254, 2008.

MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; WITTY, J. F. Further Errors in the Acetylene Reduction Assay: Effects of Plant Disturbance. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 10, p. 1581–1591, 1986.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E.; MÜLLER, M. A major error in the acetylene reduction assay: Decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, n. 5, p. 641–649, 1983.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Do you speak chemistry? Small chemical compounds represent the evolutionary oldest form of communication between organisms. **EMBO reports**, v. 17, n. 5, p. 626–9, 1 maio 2016.

MOLLOT, G.; DUYCK, P. F.; LEFEUVRE, P.; LESCOURRET, F.; MARTIN, J. F.; PIRY, S.; CANARD, E.; TIXIER, P. Cover cropping alters the diet of arthropods in a banana plantation: A metabarcoding approach. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MOLLOT, G.; TIXIER, P.; LESCOURRET, F.; QUILICI, S.; DUYCK, P.-F. New primary resource increases predation on a pest in a banana agroecosystem. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 14, n. 3, p. 317–323, ago. 2012.

MONTEIRO, A. F. M.; SUJII, E. R.; MORAIS, H. C. Chemically based interactions and nutritional ecology of *Labidus praedator* (Formicidae: Ecitoninae) in an agroecosystem adjacent to a gallery forest. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 4, p. 674–681, 2008.

MONTTI, L.; HONAINÉ, M. F.; OSTERRIETH, M.; RIBEIRO, D. G. Phytolith analysis of *Chusquea ramosissima* Lindm. (Poaceae: Bambusoideae) and associated soils. **Quaternary International**, v. 193, n. 1–2, p. 80–89, 1 jan. 2009.

MORALES-JIMÉNEZ, J.; ZÚÑIGA, G.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 879–891, 2009.

MORAN, N. A.; TELANG, A. Bacteriocyte-Associated Symbionts of Insects. **BioScience**, v. 48, n. 4, p. 295–304, 1 abr. 1998.

MORRIS, D. W. Ecological scale and habitat use. **Ecology**, v. 68, n. 2, p. 362–369, 1 abr. 1987.

MUS, F.; ALLEMAN, A. B.; PENCE, N.; SEEFELDT, L. C.; PETERS, J. W. **Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation** *Metalomics* Royal Society of Chemistry, , 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/mt/c8mt00038g>>. Acesso em: 14 set. 2020

NABITY, P. D.; ORPET, R.; MIRESMAILLI, S.; BERENBAUM, M. R. Silica and Nitrogen Modulate Physical Defense Against Chewing Insect Herbivores in Bioenergy Crops *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* (Poaceae). **DeLucia Source: Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 3, p. 878–883, 2012.

NAQQASH, T.; IMRAN, A.; HAMEED, S.; SHAHID, M.; MAJEED, A.; IQBAL, J.; HANIF, M. K.; EJAZ, S.; MALIK, K. A. First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. as growth

enhancer and root colonizer of potato. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12893, 2020.

NARDI, J. B.; MACKIE, R. I.; DAWSON, J. O. Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 8, p. 751–763, 2002.

NEUMANN, K.; STRÖMBERG, C. A. E.; BALL, T.; ALBERT, R. M.; VRYDAGHS, L.; CUMMINGS, L. S. International Code for Phytolith Nomenclature (ICPN) 2.0. **Annals of Botany**, 23 jul. 2019.

NEVES, M. C. P.; GUERRA, J. G. M.; CARVALHO, S. R. DE; RIBEIRO, R. DE L. D.; ALMEIDA, D. L. DE. Sistema Integrado de Produção Agroecológica ou Fazendinha Agroecológica do Km 47. In: [s.l: s.n.].

NKEM, J. N.; DE BRUYN, L. A L.; GRANT, C. D.; HULUGALLE, N. R. The impact of ant bioturbation and foraging activities on surrounding soil properties. **Pedobiologia**, v. 44, p. 609–621, 2000.

NODA, S.; OHKUMA, M.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; KUDO, T. Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4935–4942, 1999.

NOGUEIRA, A. R. DE A.; MATOS, A. DE O.; CARMO, C. A. F. DE S. DO; SILVA, O. J.; MONTEIRO, F. L.; OLIVEIRA, G. B. DE S.; PITTA, G. V. E.; CARLOS, G. M.; OLIVEIRA, H. DE; COMASTRI FILHO, J. A.; MIYAZAWA, M.; OLIVEIRA NETO, W. DE. **Manual de Laboratórios: solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

NOVOTNY, V.; BASSET, Y.; AUGA, J.; BOEN, W.; DAL, C.; DROZD, P.; KASBAL, M.; ISUA, B.; KUTIL, R.; MANUMBOR, M. Predation risk for herbivorous insects on tropical vegetation: A search for enemy-free space and time. **Austral Ecology**, v. 24, n. 5, p. 477–483, out. 1999.

O'DOWD, D. J. Pearl Bodies as Ant Food: An Ecological Role for Some Leaf Emergences of Tropical Plants. **Biotropica**, v. 14, n. 1, p. 40, mar. 1982.

PACHECO, J. A.; MACKAY, W. P. **THE SYSTEMATICS AND BIOLOGY OF THE NEW WORLD THIEF ANTS OF THE GENUS SOLENOPSIS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**. Lewiston, Queenston, Lampeter: The Edwin Mellen Press, 2013.

PATON, T. R.; HUMPHREYS, G. S.; MITCHELL, P. B. **Soils: a new global view**. London: UCL Press, 1995.

PERFECTO, I. Foraging behavior as a determinant of asymmetric competitive interaction between two ant species in a tropical agroecosystem. **Oecologia**, v. 98, p. 184–192, 1994.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. The agroecological matrix as alternative to the land-sparing/agriculture intensification model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5786–91, 2010.

PERRICHOT, V.; LACAU, S.; NÉRAUDEAU, D.; NEL, A. Fossil evidence for the early ant

evolution. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 2, p. 85–90, 2008.

PHILLIPS, J. D. Soils as extended composite phenotypes. **Geoderma**, v. 149, n. 1–2, p. 143–151, 15 fev. 2009.

PICKETT, J. A.; WOODCOCK, C. M.; MIDEGA, C. A.; KHAN, Z. R. Push–pull farming systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 125–132, 1 abr. 2014.

PINKALSKI, C.; DAMGAARD, C.; JENSEN, K. M. V; PENG, R.; OFFENBERG, J. Quantification of Ant Manure Deposition in a Tropical Agroecosystem: Implications for Host Plant Nitrogen Acquisition. **Ecosystems**, v. 18, n. 8, p. 1373–1382, 2015.

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W. W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R. Supporting Online Material for Symbiotic Nitrogen Fixation in the Fungus Gardens of Leaf-Cutter Ants Materials and Methods. **Science**, v. 326, n. 5956, 2009a.

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T. T.; CLELAND, W. W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R.; WALLACE CLELAND, W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **Science**, v. 326, n. November 2009, p. 1120–1123, 2009b.

PIPERNO, D. R. **Phytoliths: a comprehensive guide for archaeologists and paleoecologists**. [s.l.] Rowman Altamira, 2006.

POLLITT, E. J. G.; SZKUTA, P. T.; BURNS, N.; FOSTER, S. J. Staphylococcus aureus infection dynamics. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007112, 14 jun. 2018.

PONGE, J.-F. The soil as an ecosystem. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 6, p. 645–658, 2015.

PONGE, J. F. Disturbances, organisms and ecosystems: A global change perspective. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 1113–1124, 2013.

POORE, J.; NEMECEK, T. Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers. **Science**, v. 360, n. 6392, p. 987–992, 1 jun. 2018.

PORTHA, S.; DENEUBOURG, J.-L.; DETRAIN, C. Self-organized asymmetries in ant foraging: a functional response to food type and colony needs. **Behavioral Ecology**, v. 13, n. 6, p. 776–781, 2002.

POTPROMMANEE, L.; WANG, X.-Q.; HAN, Y.-J.; NYOBE, D.; PENG, Y.-P.; HUANG, Q.; LIU, J.; LIAO, Y.-L.; CHANG, K.-L. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175004, 13 abr. 2017.

POWELL, C. M.; HANSON, J. D.; BEXTINE, B. R. Bacterial Community Survey of *Solenopsis invicta* Buren (Red imported fire Ant) Colonies in the Presence and Absence of *Solenopsis invicta* Virus (SINV). **Current Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 580–585, 1 out. 2014.

PRESTWICH, G. D.; BENTLEY, B. L.; CARPENTER, E. J. Nitrogen sources for neotropical nasute termites: Fixation and selective foraging. **Oecologia**, v. 46, n. 3, p. 397–401, 1980.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 1 jan. 2013.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226–240, 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2018.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 667, 6 set. 2017.

RAMOS, P. L.; VAN TRAPPEN, S.; THOMPSON, F. L.; ROCHA, R. C. S.; BARBOSA, H. R.; DE VOS, P.; MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *stenotrophomonas Pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 926–931, 1 abr. 2011.

REDDY, G. V. P.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 253–261, 2004.

REMIGI, P.; ZHU, J.; YOUNG, J. P. W.; MASSON-BOIVIN, C. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63–75, jan. 2016.

REYES, R. D. H.; CAFARO, M. J. *Paratrechina longicornis* ants in a tropical dry forest harbor specific Actinobacteria diversity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 11–21, 2015.

REYNOLDS, O. L.; PADULA, M. P.; ZENG, R.; GURR, G. M. Silicon: Potential to promote direct and indirect effects on plant defense against arthropod pests in agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. June, p. 744, 13 jun. 2016.

RHINO, B.; GRECHI, I.; MARLIAC, G.; TREBEAU, M.; THIBAUT, C.; RATNADASS, A. Corn as trap crop to control *Helicoverpa zea* in tomato fields: importance of phenological synchronization and choice of cultivar. **International Journal of Pest Management**, v. 60, n. 1, p. 73–81, 2014.

RICHARDS, P. J. *Aphaenogaster* ants as bioturbators: Impacts on soil and slope processes. **Earth-Science Reviews**, v. 96, n. 1–2, p. 92–106, 2009.

RINK, W. J.; DUNBAR, J. S.; TSCHINKEL, W. R.; KWAPICH, C.; REPP, A.; STANTON, W.; THULMAN, D. K. Subterranean transport and deposition of quartz by ants in sandy sites relevant to age overestimation in optical luminescence dating. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 4, p. 2217–2226, 2013.

ROBERTS, D. L.; COOPER, R. J.; PETIT, L. J. Use of premontane moist forest and shade coffee agroecosystems by army ants in western Panama. **Conservation Biology**, v. 14, n. 1, p. 192–199, 2000.

ROSLIN, T.; HARDWICK, B.; NOVOTNY, V.; PETRY, W. K.; ANDREW, N. R.; ASMUS, A.; BARRIO, I. C.; BASSET, Y.; BOESING, A. L.; BONEBRAKE, T. C.; CAMERON, E. K.; DÁTTILO, W.; DONOSO, D. A.; DROZD, P.; GRAY, C. L.; HIK, D. S.; HILL, S. J.; HOPKINS, T.; HUANG, S.; KOANE, B.; LAIRD-HOPKINS, B.; LAUKKANEN, L.; LEWIS, O.T.; MILNE, S.; MWESIGE, I.; NAKAMURA, A.; NELL, C.S.; NICHOLS, E.; PROKURAT, A.; SAM, K.; SCHMIDT, N.M.; SLADE, A.; SLADE, V.; SUCHANKOVÁ, A.; TEDER, T.; VAN NOUHUYS, S.; VANDVIK, V.; WEISFSFLOG, A.; ZHUKOVICH, V.; SLADE, E. Latitudinal gradients: Higher predation risk for insect prey at low latitudes and elevations. **Science**, v. 356, n. 6339, p. 742–744, 19 maio 2017.

RUBIN, B. E. R.; SANDERS, J. G.; HAMPTON-MARCELL, J.; OWENS, S. M.; GILBERT, J. A.; MOREAU, C. S. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 910–921, 2014.

RUSSELL, J. A.; MOREAU, C. S.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; FUJIWARA, M.; LOHMAN, D. J.; PIERCE, N. E. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21236–21241, 2009.

SAIZ, E.; SGOURIDIS, F.; DRIJFHOUT, F. P.; ULLAH, S. Biological nitrogen fixation in peatlands: Comparison between acetylene reduction assay and 15 N 2 assimilation methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, p. 157–165, 1 abr. 2019.

SANABRIA, C.; LAVELLE, P.; FONTE, S. J. Ants as indicators of soil-based ecosystem services in agroecosystems of the Colombian Llanos. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 24–30, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, p. 8–27, 2019.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.; PINTELON, I.; STEVENS, V.; IMPERATO, V.; TIMMERMANS, J.-P.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; VAN HAMME, J.; VANGRONSVELD, J.; THIJS, S. Seed Endophyte Microbiome of *Crotalaria pumila* Unpeeled: Identification of Plant-Beneficial Methylobacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 291, 19 jan. 2018.

SAPOUNTZIS, P.; ZHUKOVA, M.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, S. J.; SCHIØTT, M.; BOOMSMA, J. J. *Acromyrmex* leaf-cutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5527–5537, 2015.

SCHÄBERLE, T. F.; LOHR, F.; SCHMITZ, A.; KÖNIG, G. M. Antibiotics from myxobacteria. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 7, p. 953–972, 2014.

SCHAETZL, R. J.; ANDERSON, S. **Soils: Genesis and Geomorphology**. 1^a ed. New York: Cambridge University Press, 2005.

SCHIPANSKI, M. E.; BARBERCHECK, M.; DOUGLAS, M. R.; FINNEY, D. M.; HAIDER, K.; KAYE, J. P.; KEMANIAN, A. R.; MORTENSEN, D. A.; RYAN, M. R.; TOOKER, J.; WHITE, C. A framework for evaluating ecosystem services provided by cover crops in agroecosystems. **Agricultural Systems**, v. 125, p. 12–22, mar. 2014.

SCHNEIRLA, T. C. Studies on army ants in Panama. **Journal of Comparative Psychology**, v. 15, n. 2, p. 267–299, 1933.

SCHNEIRLA, T. C. Raiding and Other Outstanding Phenomena in the Behavior of Army Ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 20, n. 5, p. 316–321, 1934.

SCHÖNING, C.; MOFFETT, M. W. Driver ants invading a termite nest: Why do the most catholic predators of all seldom take this abundant prey? **Biotropica**, v. 39, n. 5, p. 663–667, 2007.

SCHRÖDER, D.; DEPPISCH, H.; OBERMAYER, M.; KROHNE, G.; STACKEBRANDT, E.; HÖLLDOBLER, B.; GOEBEL, W.; GROSS, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 479–489, ago. 1996.

SCHWARTZMAN, D. W.; VOLK, T. Biotic enhancement of weathering and the habitability of Earth. **Nature**, v. 340, n. 6233, p. 457–460, 1989.

SEAMAN, R. E.; MARINO, P. C. Influence of Mound Building and Selective Seed Predation by the Red Imported Fire Ant (*Solenopsis invicta*) on an Old-Field Plant Assemblage. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 130, n. 3, p. 193, jul. 2003.

SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **PNAS**, v. 106, n. 42, p. 17805–10, 2009.

SHANNON, C. A Mathematical Theory of Communication. **Communication, Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 379–423, 1948.

SHARMA, I. P.; CHANDRA, S.; KUMAR, N.; CHANDRA, D. PGPR: Heart of soil and their role in soil fertility. In: **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**. Singapore: Springer Singapore, 2017. v. 1p. 51–67.

SHELTON, A. M.; BADENES-PEREZ, F. R. Concepts and Applications of Trap Cropping in Pest Management. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 285–308, 2006.

SHIELDS, M. W.; JOHNSON, A. C.; PANDEY, S.; CULLEN, R.; GONZÁLEZ-CHANG, M.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. History, current situation and challenges for conservation biological control. **Biological Control**, v. 131, p. 25–35, 2019.

SHOWLER, A. T.; KNAUS, R. M.; REAGAN, T. E. Studies of the territorial dynamics of the red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren, Hymenoptera: Formicidae). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 30, n. 1–2, p. 97–105, 1 jan. 1990.

SHUKLA, R. K.; SINGH, H.; RASTOGI, N.; AGARWAL, V. M. Impact of abundant Pheidole ant species on soil nutrients in relation to the food biology of the species. **Applied Soil Ecology**, v. 71, n. SEPTEMBER 2013, p. 15–23, 2013.

SILVA-JUNIOR, E. A.; RUZZINI, A. C.; PALUDO, C. R.; NASCIMENTO, F. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Pyrazines from bacteria and ants: Convergent chemistry within an ecological niche. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2595, 7 dez. 2018.

- SINGH, R. P.; JHA, P. N. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1945, 9 out. 2017.
- SIX, J.; BOSSUYT, H.; DEGRYZE, S.; DENEFF, K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. **Soil and Tillage Research**, v. 79, n. 1, p. 7–31, 2004.
- SKOURI-PANET, F.; BENZERARA, K.; COSMIDIS, J.; FÉRARD, C.; CAUMES, G.; DE LUCA, G.; HEULIN, T.; DUPRAT, E. In vitro and in silico evidence of phosphatase diversity in the biomineralizing bacterium *Ramlibacter tataouinensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 2592, 11 jan. 2018.
- SMITH, J. J.; PLATT, B. F.; LUDVIGSON, G. A.; THOMASSON, J. R. Ant-nest ichnofossils in honeycomb calcretes, Neogene Ogallala Formation, High Plains region of western Kansas, U.S.A. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 308, n. 3–4, p. 383–394, 2011.
- SMITH, V. R. Introduced slugs and indigenous caterpillars as facilitators of carbon and nutrient mineralisation on a sub-Antarctic island. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 709–713, 1 fev. 2007.
- SOARES, R. M.; FANTINATO, G. G. P.; FERREIRA, E. G. C.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 376–379, 1 ago. 2018.
- SOBHY, I. S.; ERB, M.; TURLINGS, T. C. Plant strengtheners enhance parasitoid attraction to herbivore-damaged cotton via qualitative and quantitative changes in induced volatiles. **Pest Management Science**, v. 71, n. 5, p. 686–693, 1 maio 2015.
- SOMMER, M.; KACZOREK, D.; KUZYAKOV, Y.; BREUER, J. Silicon pools and fluxes in soils and landscapes - A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, n. 3, p. 310–329, 2006.
- SONG, Z.; LIU, C.; MÜLLER, K.; YANG, X.; WU, Y.; WANG, H. **Silicon regulation of soil organic carbon stabilization and its potential to mitigate climate change** *Earth-Science Reviews* Elsevier B.V., 1 out. 2018.
- SOUZA, H. J. DE; DELABIE, J. H. C. ‘Murundus’ structures in the semi-arid region of Brazil: testing their geographical congruence with mound-building termites (Blattodea: Termitoidea: Termitidae). **Annales de la Societe Entomologique de France**, v. 52, n. 6, p. 369–385, 2016.
- SOUZA, J. L. P. DE; MOURA, C. A. R. DE; FRANKLIN, E. Eficiência em inventários de formigas em uma reserva florestal na Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 8, p. 940–948, 2009.
- SOUZA, J. L. P.; MOURA, C. A. R. Predation of ants and termites by army ants, *Nomamyrmex esenbeckii* (Formicidae, Ecitoninae). in the Brazilian Amazon. **Sociobiology**, v. 52, n. 2, 2008.
- SPATZAL, T.; PEREZ, K. A.; EINSLE, O.; HOWARD, J. B.; REES, D. C. Ligand binding to the FeMo-cofactor: Structures of CO-bound and reactivated nitrogenase. **Science**, v. 345, n. 6204, p. 1620–1623, 2014.

STAAL, M.; LINTEL-HEKKERT, S. TE; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 343–351, maio 2001.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R94–R98, 8 fev. 2016.

STILES, J. H.; JONES, R. H. Top-down Control by the Red Imported Fire Ant (*Solenopsis invicta*). **The American Midland Naturalist**, v. 146, n. 1, p. 171–185, 2001.

STREET-PERROTT, F. A.; BARKER, P. A. Biogenic silica: a neglected component of the coupled global continental biogeochemical cycles of carbon and silicon. **Earth Surf. Process. Landforms**, v. 33, p. 1436–1457, 2008.

STRÖMBERG, C. A. E.; DI STILIO, V. S.; SONG, Z. Functions of phytoliths in vascular plants: an evolutionary perspective. **Functional Ecology**, v. 30, n. 8, p. 1286–1297, 1 ago. 2016.

STRÖMBERG, C. A. E.; DUNN, R. E.; CRIFÒ, C.; HARRIS, E. B. Phytoliths in paleoecology: Analytical considerations, current use, and future directions. In: **Vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology**. [s.l.: s.n.]. p. 235–287.

STUART, R. J.; JACKSON, I. W.; MCCOY, C. W. Predation on neonate larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera : Curculionidae) in Florida citrus: Testing for daily patterns of neonate drop, ant predators and chemical repellency. **Florida Entomologist**, v. 86, n. 1, p. 61–72, 2003.

STÜEKEN, E. E.; BUICK, R.; GUY, B. M.; KOEHLER, M. C. Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 666–669, 16 abr. 2015.

SUDAKARAN, S.; KOST, C.; KALTENPOTH, M.; MORMUL, R. P.; FERREIRA, F. A.; MICHELAN, T. S.; CARVALHO, P.; SILVEIRA, M. J.; THOMAZ, S. M.; OLIVER, K. M.; MARTINEZ, A. J.; LAYEGHIFARD, M.; HWANG, D. M.; GUTTMAN, D. S.; HU, Y.; HOLWAY, D. A.; ŁUKASIK, P.; CHAU, L.; KAY, A. D.; et al. How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 375–390, 2017.

TAMAYO, D.; HEIL, M. N Fixation in Insects : Its Potential Contribution to N Cycling in Ecosystems and Insect Biomass. In: BRUIJN, F. J. DE (Ed.). . **Biological Nitrogen Fixation**. 1^a ed. [s.l.] Willey-Blackwell, 2015. v. 2p. 1141–1149.

TÄYASU, I.; SUGIMOTO, A.; WADA, E.; ABE, T. Xylophagous termites depending on atmospheric nitrogen. **Naturwissenschaften**, v. 81, n. 5, p. 229–231, 1994.

TEDESCO, M. J. .; GIANELLO, C. .; BISSANI, C. A. .; BOHNEN, H. .; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2^a ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. Brasília: EMBRAPA, 2017.

TILLBERG, C. V.; MCCARTHY, D. P.; DOLEZAL, A. G.; SUAREZ, A. V. Measuring the trophic ecology of ants using stable isotopes. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 1, p. 65–69, fev. 2006.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agriculture sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 8 August, p. 671–677, 2002.

TRIBOUILLOIS, H.; FORT, F.; CRUZ, P.; CHARLES, R.; FLORES, O.; GARNIER, E.; JUSTES, E. A Functional Characterisation of a Wide Range of Cover Crop Species: Growth and Nitrogen Acquisition Rates, Leaf Traits and Ecological Strategies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122156, 19 mar. 2015.

TSCHINKEL, W. R. Sociometry and sociogenesis of colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* during one annual cycle. **Ecological Monographs**, v. 63, n. 4, p. 425–457, fev. 1993.

TSCHINKEL, W. R. Subterranean ant nests: Trace fossils past and future? **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 192, n. 1–4, p. 321–333, 2003.

TSCHINKEL, W. R. Biomantling and bioturbation by colonies of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2015.

TSCHUMI, M.; ALBRECHT, M.; COLLATZ, J.; DUBSKY, V.; ENTLING, M. H.; NAJAR-RODRIGUEZ, A. J.; JACOT, K. Tailored flower strips promote natural enemy biodiversity and pest control in potato crops. **Journal of Applied Ecology**, v. 53, n. 4, p. 1169–1176, 1 ago. 2016.

TUBAÑA, B. S.; HECKMAN, J. R. Silicon in soils and plants. In: **Silicon and Plant Diseases**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 7–51.

TUMA, J.; EGGLETON, P.; FAYLE, T. M. Ant-termite interactions: an important but under-explored ecological linkage. **Biological Reviews**, v. 95, n. 3, p. 555–572, 25 jun. 2020.

TWISS, P. C. Predicted World Distribution of C3 and C4 Grass Phytoliths. In: **Phytolith Systematics**. [s.l.] Springer US, 1992. p. 113–128.

TZIPERMAN, E.; HALEVY, I.; JOHNSTON, D. T.; KNOLL, A. H.; SCHRAG, D. P. Biologically induced initiation of Neoproterozoic snowball-Earth events. **PNAS**, v. 108, n. 37, p. 15091–6, 2011.

VAN DAM, N. M.; BOUWMEESTER, H. J. Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 256–265, 2016.

VAN DEN BERG, H. **Natural control of *Helicoverpa armigera* in smallholder crops in East Africa**. Wageningen: Wageningen University & Research, 1993.

VAN DER PUTTEN, W. H.; BARDGETT, R. D.; DE RUITER, P. C.; HOL, W. H. G.; MEYER, K. M.; BEZEMER, T. M.; BRADFORD, M. A.; CHRISTENSEN, S.; EPPINGA, M. B.; FUKAMI, T.; HEMERIK, L.; MOLOFSKY, J.; SCHÄDLER, M.; SCHERBER, C.; STRAUSS, S. Y.; VOS, M.; WARDLE, D. A. Empirical and theoretical challenges in aboveground-belowground ecology. **Oecologia**, v. 161, n. 1, p. 1–14, 2009.

VASCONCELLOS, A.; SANTANA, G. G.; SOUZA, A. K. Nest spacing and architecture, and swarming of males of *Dinoponera quadricaps* (Hymenoptera, Formicidae) in a remnant of the Atlantic forest in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 2, p. 357–362, 2004.

VIDKJÆR, N. H.; WOLLENWEBER, B.; GISLUM, R.; JENSEN, K. M. V.; FOMSGAARD, I. S. Are ant feces nutrients for plants? A metabolomics approach to elucidate the nutritional effects on plants hosting weaver ants. **Metabolomics**, v. 11, n. 4, p. 1013–1028, 2015.

VIEIRA, A. S.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; FERNANDES, W. D. Modelo arquitetônico de ninhos da formiga *Ectatomma vizotoi* Almeida (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 489, n. 1997, p. 489–493, 2007.

VIMAL, S. R.; PATEL, V. K.; SINGH, J. S. Plant growth promoting *Curtobacterium albidum* strain SRV4: An agriculturally important microbe to alleviate salinity stress in paddy plants. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 553–562, 1 out. 2019.

VITOUSEK, P. M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C. B.; GRIMM, N. B.; HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E. B.; SPRENT, J. I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, v. 5758, p. 1–45, 2002.

VOGT, J. T.; GRANTHAM, R. A.; SMITH, W. A.; ARNOLD, D. C. Prey of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) in Oklahoma Peanuts. **Environmental Entomology**, v. 30, n. 1, p. 123–128, 1 fev. 2001.

WANG, D.; MCSWEENEY, K.; LOWERY, B.; NORMAN, J. M. Nest structure of ant *Lasius neoniger* Emery and its implications to soil modification. **Geoderma**, v. 66, n. 3, p. 259–272, 1995.

WARD, P. S. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, v. 563, n. 1668, p. 549–563, 2007.

WARD, P. S. The Phylogeny and Evolution of Ants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 45, n. 1, 2014.

WEBER, M. G.; PORTURAS, L. D.; KEELER, K. H. **World List of Plants with Extrafloral Nectaries - Home**. Disponível em: <<http://www.extrafloralnectaries.org/>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

WEIL, R. R.; BRADY, N. C. **The Nature and Properties of Soils**. 15. ed. Essex: Pearson Higher Ed USA, 2016.

WHITE, A. F.; VIVIT, D. V.; SCHULZ, M. S.; BULLEN, T. D.; EVETT, R. R.; AAGARWAL, J. Biogenic and pedogenic controls on Si distributions and cycling in grasslands of the Santa Cruz soil chronosequence, California. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 94, p. 72–94, 1 out. 2012.

WIELGOSS, A.; TSCHARNTKE, T.; RUMEDE, A.; FIALA, B.; SEIDEL, H.; SHAHABUDDIN, S.; CLOUGH, Y. Interaction complexity matters: disentangling services and disservices of ant communities driving yield in tropical agroecosystems. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132144–20132144, 2013.

WIELGOSS, A.; TSCHARNTKE, T.; RUMEDE, A.; FIALA, B.; SEIDEL, H.; SHAHABUDDIN, S.; CLOUGH, Y. Interaction complexity matters: disentangling services and disservices of ant communities driving yield in tropical agroecosystems. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, 2014.

WILKINSON, M. T.; RICHARDS, P. J.; HUMPHREYS, G. S. Breaking ground: Pedological, geological, and ecological implications of soil bioturbation. **Earth-Science Reviews**, v. 97, n. 1–4, p. 257–272, 2009.

WILSKE, B.; ECCARD, J. A.; ZISTL-SCHLINGMANN, M.; HOHMANN, M.; METHLER, A.; HERDE, A.; LIESENJOHANN, T.; DANNENMANN, M.; BUTTERBACH-BAHL, K.; BREUER, L. Effects of short term bioturbation by common voles on biogeochemical soil variables. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

WILSON, E. O. The organization of colony defense in the ant *Pheidole dentata* mayr (Hymenoptera: Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 1, n. 1, p. 63–81, 1976.

WILSON, E. O.; TAYLOR, R. W. A fossil ant colony. **Psyche**, v. 71, n. 1964, p. 93–103, 1964.

WONISCH, H.; GÉRARD, F.; DIETZEL, M.; JAFFRAIN, J.; NESTROY, O.; BOUDOT, J. P. Occurrence of polymerized silicic acid and aluminum species in two forest soil solutions with different acidity. **Geoderma**, v. 144, n. 3–4, p. 435–445, 15 abr. 2008.

WOOLFOLK, S.; STOKES, C. E.; WATSON, C.; BROWN, R.; BAIRD, R. Bacteria Associated with Red Imported Fire Ants (*Solenopsis invicta*) from Mounds in Mississippi. **Southeastern Naturalist**, v. 15, n. 1, p. 83–101, 1 mar. 2016.

WU, D.; ZENG, L.; ZHOU, A.; XU, Y. Effects of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) Tending on the Probing Behavior of *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1343–1349, 1 dez. 2013.

YAN, G. C.; NIKOLIC, M.; YE, M. JUN; XIAO, Z. X.; LIANG, Y. C. Silicon acquisition and accumulation in plant and its significance for agriculture. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2138–2150, 2018.

YI, Z.; YU, S. H. I.; HAI-JUN, G.; HAI-LIANG, Z.; HUAN-LI, L. I.; YAN-HONG, H. U.; YI-CHAO, W. Beneficial effects of silicon on photosynthesis of tomato seedlings under water stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 10, p. 2151–2159, 2018.

ZADEL, U.; NESME, J.; MICHALKE, B.; VESTERGAARD, G.; PŁAZA, G. A.; SCHRÖDER, P.; RADL, V.; SCHLOTTER, M. Changes induced by heavy metals in the plant-associated microbiome of *Miscanthus x giganteus*. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134433, 1 abr. 2020.

ZHANG, W.; JIA, X.; CHEN, S.; WANG, J.; JI, R.; ZHAO, L. Response of soil microbial communities to engineered nanomaterials in presence of maize (*Zea mays* L.) plants. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115608, 2020.

ZHANG, Y.; GAO, X.; SHEN, Z.; ZHU, C.; JIAO, Z.; LI, R.; SHEN, Q. Pre-colonization of PGPR triggers rhizosphere microbiota succession associated with crop yield enhancement. **Plant and Soil**, v. 439, n. 1–2, p. 553–567, 15 jun. 2019.