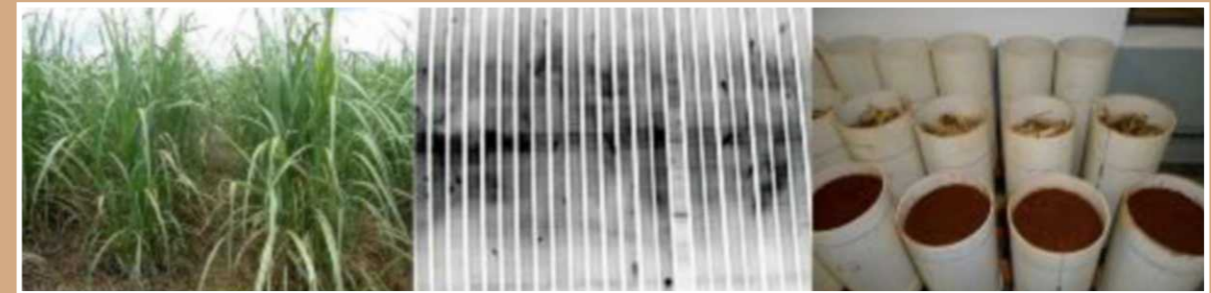




**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS CULTIVADOS COM  
CANA-DE-AÇÚCAR (*SACHARUM SPP.*)  
EM SÃO PAULO, BRASIL**

ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS CULTIVADOS COM  
CANA-DE-AÇÚCAR (*SACHARUM SPP.*) EM SÃO PAULO, BRASIL



**RÉGIA MARIA REIS GUALTER**

TESIS DOCTORAL

La Coruña, Septiembre de 2017

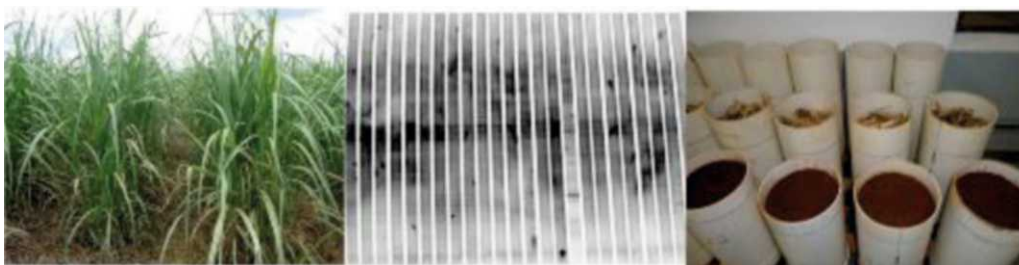
RÉGIA MARIA  
REIS GUALTER

2017



Tese de Doutoramento

**Atributos microbiológicos em solos cultivados  
com cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*)  
em São Paulo, Brasil**



Régia Maria Reis Gualter

A Coruña, Setembro de 2017

Atributos microbiológicos em solos cultivados  
com cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*)  
em São Paulo, Brasil

Autora: Régia Maria Reis Gualter

---

Tesis doctoral UDC / Año 2017

Directora: Eva Vidal Vázquez

Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal





**Dña. Eva VIDAL VÁZQUEZ**, Profesora Contratada Doctora del Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidade da Coruña (UDC)

**CERTIFICA**

Que la presente memoria titulada “***Atributos microbiológicos em solos cultivados com cana-de-açúcar (Sacharum spp.) em São Paulo, Brasil***”, que para optar al grado de Doctor por la Universidade da Coruña presenta **Dña. Régia Maria REIS GUALTER**, ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión dentro del Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal.

Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en A Coruña, a 1 de septiembre de 2017.

Fdo.: Eva Vidal Vázquez

“Enquanto acreditarmos em nossos sonhos, nada será por acaso”

Henfil

*“The important is to believe that it is possible...”*

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

À Deus, por ser meu mentor e protetor  
em todos os momentos.

#### **OFEREÇO**

Ao meu amado Khalil, esposo, amigo,  
professor, pai, irmão que me  
acompanha em todos os passos dessa  
jornada, incentivando a persistir nos  
meus anseios e, a superar as  
dificuldades impostas pela vida. À  
minha mãe Dalva por todo amor e  
carinho, e por me oferecer toda  
assistência ao longo dessa caminhada.  
Ao meu pai Francisco José e aos meus  
irmãos Thiago, Tainah e Marcellino por  
se fazerem presentes em todas as  
etapas da minha trajetória me auxiliando  
e apoiando.

#### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me privilegiar com todas as graças já alcançadas e proporcionar a sabedoria e serenidade necessárias para enfrentar os obstáculos.

Ao meu querido Khalil, pelo incentivo, ajuda nas análises estatísticas, paciência e cumplicidade. Essa conquista não é minha, mas nossa.

Aos meus familiares, que respiram conhecimento nas suas diversas formas, especialmente a minha mãe, que com suas palavras me manteve de pé em momentos cruciais ao longo da minha carreira escolar e acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos (Processo 2011/06108-2) e pelo auxílio (Projeto BIOEN – 2008/56147-1).

À Universidade da Corunha e ao Programa de Investigação Agrária e Florestal pela oportunidade de realizar o curso de doutoramento.

Ao Dr. Glécio Machado Siqueira e ao Dr. Antonio Paz González pela confiança, críticas, elogios e sugestões. Agradeço.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Campus Caxias pela disponibilidade na liberação do afastamento para cursar o Doutorado e aos servidores do campus, em especial ao diretor geral Dr. João da Paixão Soares.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas e a Dra. Adriana Parada Dias da Silveira pela permissão na utilização do alojamento e dos laboratórios dessa instituição.

Ao Dr. Vitor Paulo Vargas e ao Dr. Heitor Cantarella pela autorização e assistência nas amostragens de solo nos experimentos em campo e em condições controladas.

À Rosana Gierts Gonçalves pelos preciosos ensinamentos, pela dedicação, competência e simplicidade em demonstrar o estado da arte da microbiologia.

À Tatiane Oliveira de Souza pela enorme colaboração nas análises microbiológicas e a Patrícia Goes de Oliveira pela amizade, convivência harmoniosa e conversas sempre descontraídas e animadas.

Ao Dr. Fernando Dini Andreotte pelos valiosos conhecimentos transmitidos e compartilhados e aos Dr. Ademir Durrer Bigaton, Dr. Thiago Gumiere e ao doutorando Pedro Avelino Maia de Andrade pela contribuição nas análises moleculares.

Às minhas queridas cadelinhas Pelanka, Costelina (*in memoriam*) e Gita por serem tão companheiras e leais.

Aos que direta e indiretamente, colaboraram para que a presente obra fosse finalizada.

**Meus singelos agradecimentos.**

## RESUMO

### **Atributos microbiológicos em solos cultivados com cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*) em São Paulo, Brasil**

Os microrganismos estão presentes em grande diversidade e abundância no solo. Contudo, as atividades antrópicas, que resultam principalmente do uso e manejo inadequado do solo, têm provocado mudanças na estrutura dessas comunidades de organismos. A cultura da cana-de-açúcar, bastante intensa no estado de São Paulo, ainda foi pouco estudada em relação às possíveis mudanças na microbiota do solo, em função de fatores como umidade, temperatura, palha e adubação nitrogenada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de fatores abióticos nos atributos microbiológicos de solos cultivados com cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Foram realizados ensaios de laboratório sob condições controladas, visando avaliar o efeito da temperatura e umidade na microbiota do solo. Além disso, foram avaliadas duas áreas de soqueira de cana-de-açúcar nos municípios de Piracicaba, e Jaú ambos localizados em São Paulo, contendo os seguintes tratamentos: com ou sem N (0 e 150 kg ha<sup>-1</sup>), na forma de nitrato de amônio em duas profundidades de 0-10 e 10-20 cm. Foram realizadas amostragens de terra para análise de estrutura genética das comunidades bacterianas e dos atributos do solo, tais como fertilidade, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, respiração basal, quantificação de comunidades específicas de bactérias amonificadores, nitrificadores, nitratores, e enzimas do solo. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de médias e análise estatística multivariada pelas análises de componentes principais (PCA), análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), análise de similaridade (ANOSIM) e correlação linear simples, pelo teste de Pearson, entre as características do solo estudadas. No experimento em condições controladas, com diferentes umidades, com adição ou não de palha, e com aplicação ou de nitrogênio, a respiração do solo e o qCO<sub>2</sub> foram influenciados pelo incremento das umidades, especialmente pela umidade 100% nos dois períodos de incubação do solo. O nitrogênio da biomassa microbiana se correlacionou com a palha, independente da adição de adubação nitrogenada. O carbono da biomassa microbiana não foi influenciado pelos tratamentos aplicados nos experimentos realizados. O perfil das comunidades bacterianas revelou uma alta correlação da umidade e da palha em possíveis mudanças na composição microbiana, principalmente na umidade 100%. No experimento em condições controladas, com diferentes temperaturas, com adição ou

não de palha, e com aplicação ou não de nitrogênio, a respiração do solo e a razão C/N foram correlacionadas a ausência de palha e influenciadas pela presença de adubação nitrogenada na temperatura de 20°C. O carbono da biomassa microbiana foi influenciado pela presença da palha e pela temperatura de 30°C. De modo geral, o nitrogênio da biomassa microbiana foi influenciado primeiramente pela presença da palha e secundariamente pela adubação nitrogenada. Nos experimentos em condições de campo, a respiração basal foi o indicador mais sensível em relação à mudança na profundidade na área 1, enquanto o carbono da biomassa microbiana, o quociente metabólico e os nitratores não foram influenciados pela aplicação dos tratamentos nas áreas estudadas. Os nitratores foram correlacionados a ausência de nitrogênio na profundidade de 0-10 cm, enquanto os nitratores e os amonificadores se relacionaram ao tratamento com adubação nitrogenada na profundidade de 10-20 cm independente da área avaliada.

**Palavras chave:** análises integradas, DGGE, microbiota do solo.



## RESUMEN

### **Propiedades microbiológicas en suelos cultivados con caña de azúcar (*Sacharum spp.*) en São Paulo, Brasil**

Los microorganismos están presentes en gran diversidad y abundancia en el suelo. Sin embargo, las actividades antrópicas, que resultan principalmente del uso y manejo inadecuado del suelo, han provocado cambios en la estructura de esas comunidades de organismos. El cultivo de la caña de azúcar, bastante extendido en el Estado de São Paulo, todavía ha sido poco estudiado en relación a los posibles cambios en la microbiota del suelo, en función de factores como humedad, temperatura, cobertura vegetal y fertilización nitrogenada. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de factores abióticos en las propiedades microbiológicas de suelos cultivados con caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Se realizaron ensayos de laboratorio bajo condiciones controladas, para evaluar el efecto de la temperatura y humedad en la microbiota del suelo. Además, se evaluaron dos áreas de tocones de caña de azúcar en los municipios de Piracicaba y Jaú, ambos ubicados en São Paulo, en las que se realizaron los siguientes tratamientos: con o sin N (0 y 150 kg ha<sup>-1</sup>), en forma de nitrato de amonio en dos profundidades: de 0-10 y de 10-20 cm. Se tomaron muestras de suelo para el análisis de la estructura genética de las comunidades bacterianas y de diferentes propiedades del suelo referidas a la fertilidad, el carbono y el nitrógeno de la biomasa microbiana, respiración basal, cuantificación de comunidades específicas de bacterias amonificadoras, nitritadoras, nitradoras, y enzimas del suelo. Los resultados fueron evaluados mediante el análisis de varianza y test de medias y el análisis estadístico multivariado mediante el análisis de componentes principales (PAC), análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (NMDS), análisis de similitud (ANOSIM) y correlación lineal simple de Pearson, para las propiedades del suelo estudiadas. En el experimento en condiciones controladas, con diferentes humedades, con adición o no de cobertura vegetal, y con aplicación o de nitrógeno, la respiración del suelo y el qCO<sub>2</sub> se vieron influenciados por el incremento de las humedades, especialmente por la humedad del 100% en los dos períodos de incubación del suelo. El nitrógeno de la biomasa microbiana se correlacionó con la cobertura, independientemente de la adición de fertilización nitrogenada. El carbono de la biomasa microbiana no se vio influenciado por los tratamientos aplicados en los experimentos realizados. El perfil de las comunidades bacterianas reveló una alta correlación de la humedad y la paja de cobertura en posibles cambios en la composición microbiana, principalmente en la humedad del 100%. En el experimento

en condiciones controladas, con diferentes temperaturas, con adición o no de paja, y con aplicación o no de nitrógeno, la respiración del suelo y la relación C/N se correlacionaron con la ausencia de paja y se vieron influenciadas por la presencia de fertilización nitrogenada a la temperatura de 20°C. El carbono de la biomasa microbiana se vio influido por la presencia de la cobertura y la temperatura de 30°C. En general, el nitrógeno de la biomasa microbiana está relacionado principalmente con la presencia de la cobertura y secundariamente con la fertilización nitrogenada. En los experimentos en condiciones de campo, la respiración basal fue el indicador más sensible en relación al cambio en la profundidad en el área 1, mientras que el carbono de la biomasa microbiana, el cociente metabólico y los nitratores no estuvieron influenciados por la aplicación de los tratamientos en las áreas estudiadas. Los nitritadores se correlacionaron con la ausencia de nitrógeno en la profundidad de 0-10 cm, mientras que los nitratores y los amonificadores se relacionaron con el tratamiento con fertilización nitrogenada en la profundidad de 10-20 cm independientemente del área evaluada.

**Palabras clave:** análisis integrados, DGGE, microbiota del suelo.

## RESUMO

### **Propiedades microbiolóxicas en solos cultivados con cana de azucre (*Sacharum spp.*) em São Paulo, Brasil**

Os microorganismos están presentes en gran diversidade e abundancia no solo. Con todo, as actividades antrópicas, que resultan especialmente do uso e manexo inadecuado do solo, provocaron cambios na estrutura destas comunidades de organismos. O cultivo de cana de azucre, bastante extendido no Estado de São Paulo, aínda está pouco estudado en relación a posibles cambios na microbiota do solo debido a factores como humidade, temperatura, cobertura vexetal e abonado nitroxenado. Así, o obxectivo deste estudo foi avaliar os efectos de factores abióticos nas propiedades microbiolóxicas de solos cultivados con cana de azucre (*Saccharum spp.*). Realizáronse ensaios de laboratorio en condicións controladas, de cara a avaliar o efecto da temperatura e a humidade na microbiota do solo. Ademais, foron avaliadas dúas áreas de tocóns de cana de azucre nos municipios de Piracicaba e Jaú, ambos situados en São Paulo, nos que se estudaron os seguintes tratamentos: con ou sen N (0 e 150 kg ha<sup>-1</sup>), en forma de nitrato de amonio en dúas profundidades: de 0-10 e de 10-20 cm. Tomáronse mostras de solo para a análise da estrutura xenética das comunidades bacterianas e das propiedades do solo, incluíndo análises referidas á fertilidade, carbono e nitróxeno da biomasa microbiana, respiración basal, cuantificación de comunidades específicas de bacterias amonificadoras, nitrificadoras, nitradoras, e enzimas do solo. Os resultados foron sometidos á análise de varianza e test de medias e análise estatística multivariante mediante a análises de compoñentes principais (PCA), análise de planificación multidimensional non métrico (NMDS), análise de similaridade (ANOSIM) e correlación linear simple, pola proba de Pearson, entre as propiedades do solo estudadas. No experimento en condicións controladas, con diferentes humidades, con adición ou non de cobertura vexetal, e con aplicación ou non de nitróxeno, a respiración do solo e o qCO<sub>2</sub> foron influenciados polo incremento das humidades, especialmente pola humidade 100% nos dous períodos de incubación do solo. O nitróxeno da biomasa microbiana correlacionouse coa palla de cobertura, independentemente da adición de abonado nitroxenado. O carbono da biomasa microbiana non foi influenciado polos tratamentos aplicados nos experimentos realizados. O perfil das comunidades bacterianas revelou unha alta correlación da humidade e da cobertura en posibles cambios na composición microbiana, sobre todo na humidade 100%. No experimento en condicións controladas, con diferentes temperaturas, con adición ou non de palla, e con aplicación

ou non de nitróxeno, a respiración do solo e a relación C/N estiveron correlacionadas coa ausencia de palla e influenciadas pola presenza de abonado nitroxenado coa temperatura de 20°C. O carbono da biomasa microbiana viuse influenciado pola presenza da palla e pola temperatura de 30°C. De xeito xeral, o nitróxeno da biomasa microbiana foi influenciado primeiramente pola presenza da palla e secundariamente polo abonado nitroxenado. Nos experimentos en condicións de campo, a respiración basal foi o indicador máis sensible respecto ao cambio en profundidade na zona 1, mentres que o carbono da biomasa microbiana, o cociente metabólico e os nitratores non foron influenciados pola aplicación dos tratamentos nas áreas estudadas. Os nitratores foron correlacionados coa ausencia de nitróxeno na profundidade de 0-10 cm, mentres que os nitratores e os amonificadores se correlacionaron co tratamento con abonado nitroxenado na profundidade de 10-20 cm independente da área avaliada.

**Palabras chave:** análises integradas, DGGE, microbiota do solo.

## ABSTRACT

### **Microbiological attributes in soils cultivated with sugar cane (*Sacharum spp.*) in São Paulo, Brazil**

The microorganisms are present in great diversity and abundance in the soil. However, the anthropic activities, which result mainly from the inappropriate use and management of the soil, have caused changes in the structure of these communities of organisms. The cultivation of sugarcane, quite intense in the state of São Paulo, was still little studied in relation to possible changes in the soil microbiota, due to factors such as humidity, temperature, straw and nitrogen fertilization. The objective of this study was to evaluate the effects of abiotic factors on the microbiological attributes of soils cultivated with sugarcane (*Saccharum spp.*). Laboratory tests were carried out under controlled conditions to evaluate the effect of temperature and humidity on the soil microbiota. In addition, two areas of sugarcane ratoon were evaluated in the municipalities of Piracicaba and Jaú, both located in SP, with the following treatments: with or without N (0 and 150 kg ha<sup>-1</sup>), in the form of nitrate of ammonium in two depths of 0-10 and 10-20 cm. Land sampling was performed to analyze the genetic structure of bacterial communities and soil attributes, such as fertility, carbon and nitrogen from microbial biomass, basal respiration, quantification of specific communities of ammonia bacteria, nitrifying agents, nitrates, and soil enzymes. The results were submitted to analysis of variance and test of means and multivariate statistical analysis by principal component analyzes (PCA), non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS), similarity analysis (ANOSIM) and simple linear correlation by the test of Pearson, among the soil characteristics. In the experiment under controlled conditions, with different humidity, with or without straw, and with application or nitrogen, soil respiration and qCO<sub>2</sub> were influenced by the increase of humidity, especially by 100% humidity in the two soil incubation periods. The nitrogen of the microbial biomass was correlated with the straw, independent of the addition of nitrogen fertilization. The carbon of the microbial biomass was not influenced by the treatments applied in the experiments. The profile of bacterial communities revealed a high correlation between moisture and straw in possible changes in microbial composition, especially in 100% humidity. In the experiment under controlled conditions, with different temperatures, with or without straw, and with or without nitrogen application, soil respiration and C/N ratio were correlated with the absence of straw and influenced by the presence of nitrogen fertilization at the temperature of 20°C. The carbon of the microbial biomass was

influenced by the presence of the straw and by the temperature of 30°C. In general, the nitrogen of the microbial biomass was influenced firstly by the presence of the straw and secondarily by the nitrogen fertilization. In the experiments under field conditions, basal respiration was the most sensitive indicator in relation to the change in depth in area 1, while microbial biomass carbon, metabolic quotient and nitrators were not influenced by the application of the treatments in the studied areas. The nitrifying agents were correlated to the absence of nitrogen in the depth of 0-10 cm, while the nitrators and the ammonifiers were related to the treatment with nitrogen fertilization in the depth of 10- 20 cm independent of the evaluated area.

**Keywords:** integrated analysis, DGGE, soil microbiota.

## RESUMEN EXTENSO

### Propiedades microbiológicas en suelos cultivados con caña de azúcar (*Sacharum spp.*) en São Paulo, Brasil

#### 1. Introducción

La caña de azúcar es importante a nivel mundial y se cultiva en varios países. Se trata de un producto agrícola básico, con un destacado componente ambiental y social, ya que sirve de fuente para la producción de alcohol, azúcar y etanol, garantizando, además, empleo y crecimiento económico.

En Brasil, la producción de caña de azúcar es de 684,77 millones de toneladas, siendo la productividad de 76.313 kg ha<sup>-1</sup>, y el Estado de São Paulo destaca como el mayor productor. Es el tercer cultivo en referencia, detrás de la soja y el maíz. Sin embargo, su productividad es superior a la de los cultivos citados, especialmente debido a su extraordinaria eficiencia de conversión fotosintética.

Ante la importancia comercial de la caña de azúcar, resultan imprescindibles los estudios que posibiliten comprender la calidad edáfica en áreas cultivadas con esa especie, además de estudiar las características ambientales de ese agroecosistema. Así, el conocimiento de la actuación de factores abióticos que participan activamente en ese sistema agrícola tales como cobertura vegetal, humedad, temperatura y nitrógeno son necesarios, ya que la evaluación de éstos puede contribuir al monitoreo y control de impactos que lleven a la degradación del suelo. Una de las formas de evaluar estos impactos es a partir de los parámetros microbiológicos, principalmente la biomasa microbiana (BM) y la composición de las comunidades de microorganismos del suelo.

La biomasa microbiana se expresa a partir de su actividad, mediante la respiración basal del suelo (RBS) y de su porcentaje de carbono y del carbono orgánico total del suelo, pudiendo determinar los índices que definen la dinámica del C. La relación entre la actividad microbiana y el carbono de la biomasa microbiana indica su cociente metabólico, esto es, la cantidad de carbono inmovilizado en la biomasa microbiana. La relación entre el carbono de la biomasa microbiana y el carbono orgánico total del suelo indica el cociente microbiano, que determina la eficiencia de la biomasa microbiana en el uso del carbono orgánico del suelo.

Los microorganismos del suelo están presentes con gran diversidad y abundancia, estando representados por arqueobacterias, bacterias, hongos, virus, algas o actinomicetos, entre otros. Estos grupos microbianos del suelo desempeñan

innumerables funciones como son la descomposición, inmovilización de materia orgánica, reciclaje de nutrientes, flujo de energía y agregación del suelo, donde alteraciones en la constitución de esa microbiota del suelo pueden afectar las modificaciones biogeoquímicas de los elementos químicos de interés agrícola, especialmente del nitrógeno que es responsable del crecimiento y del desarrollo vegetal.

Entre las técnicas utilizadas para el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas se destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) junto con la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE). Primero se averigua parte de la secuencia del gen rRNA 16S de bacterias, a partir de la amplificación por PCR, siendo luego distinguida por medio de técnicas como la DGGE.

A pesar de la importancia de las investigaciones sobre las propiedades microbiológicas y su relación con las comunidades de microorganismos del suelo en el cultivo de la caña de azúcar, los trabajos en el Estado de São Paulo, Brasil, son muy escasos. En este sentido, debido a la ausencia de resultados concluyentes, son necesarios estudios para evaluarlos.

## **2. Objetivos e hipótesis**

### **2.1. Objetivos generales y específicos**

El objetivo general de este estudio es evaluar los efectos de factores abióticos en las propiedades microbiológicas en suelos cultivados con caña de azúcar (*Saccharum spp*).

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Evaluar las modificaciones en la actividad y estructura de la comunidad bacteriana en suelo previamente cultivado con caña de azúcar en función de la cobertura, de la humedad y del nitrógeno;
- b) Evaluar el efecto de la adición de cobertura vegetal, del nitrógeno y de la temperatura en el suelo anteriormente cultivado con caña de azúcar en la actividad y biomasa microbianas;
- c) Relacionar las propiedades microbiológicas del suelo con las variables ambientales (cobertura, humedad, temperatura y nitrógeno).
- d) Cuantificar comunidades específicas de bacterias (amonificadores, nitrificantes), en suelo cultivado con caña de azúcar.



## 2.2. Hipótesis del trabajo

Los factores abióticos (cobertura, nitrógeno, humedad y temperatura) influyen en la actividad y estructura de las comunidades microbianas del suelo cultivado con caña de azúcar.

## 3. Material y Métodos

El trabajo fue desarrollado en el estado de São Paulo, Brasil, donde se realizaron ensayos de incubación de suelo bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Fertilidad del Suelo del Centro de Solos e Recursos Ambientais del Instituto Agronómico (IAC) en Campinas-SP. Para la realización de estos experimentos, el suelo y la cubierta vegetal utilizados fueron retirados de un cultivo de caña de azúcar, localizado en la Estación Experimental de la Agencia Paulista de Tecnología de los Agronegocios (APTA) ubicada en Piracicaba, São Paulo, donde se venía cultivando durante cerca de 10 años. Las muestras de suelo fueron recogidas de 0-20 cm de profundidad. El análisis granulométrico mostró un suelo de textura muy arcillosa, presentando 658, 123 y 219 g kg<sup>-1</sup> de arcilla, limo y arena, respectivamente. En cuanto a la cobertura de caña de azúcar, se utilizaron hojas en fase de senescencia de plantas de la variedad SP 81-3250.

El primer experimento constó de un factorial triple compuesto por cuatro humedades (100, 75, 50 y 25% de la capacidad de retención de agua), dos niveles de cobertura (0 y 16 Mg ha<sup>-1</sup>) y dos niveles de nitrógeno (0 y 21 kg ha<sup>-1</sup>), evaluado en dos períodos de muestreo, a los 142 y 205 días de incubación de suelo (DIS). El diseño experimental utilizado fue al azar, con tres repeticiones. El segundo ensayo también consistió en un factorial triple incluyendo dos temperaturas (20 y 30°C), dos niveles de cobertura (0 y 8 Mg masa seca ha<sup>-1</sup>) y dos niveles de nitrógeno (0 y 100 kg ha<sup>-1</sup>) en dos períodos de muestreo, a los 76 y 168 DIS. El diseño experimental utilizado fue al azar, con tres repeticiones.

Se analizaron las siguientes propiedades: el carbono (CBM) y el nitrógeno de la biomasa microbiana (NBM), la relación C/N microbiana (C/N<sub>mic</sub>), la respiración basal del suelo (RBS), el cociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) en ambos ensayos y la estructura de las comunidades de bacterias utilizando la técnica de la PCR-DGGE del gen rRNA 16S, en el primer experimento. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Centro de Solos e Recursos Ambientais del Instituto Agronómico (IAC) en Campinas, SP. Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del suelo de la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) en Piracicaba, SP.

Para los análisis de la estructura de las comunidades bacterianas, se recogieron muestras que contenían aproximadamente 20 gramos de suelo de cada tratamiento, siendo almacenados en ultra congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de ADN total del suelo diez gramos de cada tratamiento, que fueron almacenados en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de ADN total del suelo.

Se realizaron análisis químicos en el horizonte superficial del suelo, de 0-20 cm, estudiándose las siguientes propiedades: pH en  $\text{CaCl}_2$  (5,2), P ( $16,0 \text{ mg/dm}^3$ ), K ( $2,5 \text{ mmolc/dm}^3$ ), Ca ( $27 \text{ mmolc/dm}^3$ ), Mg ( $9,0 \text{ mmolc/dm}^3$ ), H+Al ( $34 \text{ mmolc/dm}^3$ ), MOS ( $26,0 \text{ g/dm}^3$ ), CTC (72,4), V (53%), CT ( $16,8 \text{ g/Kg}$ ) y NT ( $1,1 \text{ g/Kg}$ ). La paja de cobertura también fue analizada químicamente y contenía los siguientes elementos: C ( $450 \text{ g/Kg}$ ), N ( $4,0 \text{ g/Kg}$ ), P ( $0,2 \text{ g/Kg}$ ) K ( $1,5 \text{ g/Kg}$ ), Ca ( $3,9 \text{ g/Kg}$ ) y Mg ( $1,3 \text{ g/Kg}$ ). Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Fertilidad del suelo del Centro de Solos e Recursos Ambientales del Instituto Agronómico (IAC) en Campinas-SP.

Además, se evaluaron dos áreas con raíces de caña de azúcar cortada en los municipios de Piracicaba (Área 1) y Jaú (Área 2), ambos ubicados en São Paulo, que contenían tratamientos con y sin aplicación de nitrógeno ( $0$  y  $150 \text{ kg ha}^{-1}$ ), en forma de nitrato de amonio, muestreados en las profundidades de 0-10 y 10-20 cm. El diseño experimental utilizado fue el de bloques al azar con cuatro repeticiones. El cultivo de la caña de azúcar se estableció en las áreas hace más de 10 años. Las plantaciones se produjeron en abril de 2010 y se realizaron labores de arado profundo, gradeado, además de la formación de surcos en el suelo.

En los muestreos del suelo en el campo, se recogieron cuatro muestras compuestas por cada punto, en las profundidades de 0-10 cm y de 10-20 para los análisis de las propiedades microbiológicas. Las muestras fueron acondicionadas en bolsas plásticas y transportadas al laboratorio, donde fueron tamizadas a 2 mm y homogeneizadas y divididas en dos fracciones, una de ellas se conservó en la nevera hasta el momento de su uso para los análisis microbiológicos y con la otra se obtuvo tierra fina seca al aire (TFSA), conservándose a temperatura ambiente para los análisis químicos.

Las propiedades microbiológicas analizadas fueron: CBM, NBM, C/Nmic, RBS,  $\text{qCO}_2$ , cuantificación de comunidades específicas de microorganismos amonificadores (AMO), nitritadores (NITRI), nitratadores (NITRA) y análisis enzimáticos (deshidrogenasa, proteasa y fosfatasa alcalina) en el Área 2.

Los resultados de todos los experimentos, fueron sometidos al análisis de varianza y las medias, comparadas mediante el test de Tukey al 5% de probabilidad, siendo los datos analizados con el software SISVAR. Se realizaron correlaciones

lineales simples, mediante el test de Pearson entre las características estudiadas a partir del software Assistat. Además, se realizaron análisis de gradiente indirecto con el programa CANOCO® versión 4.5, donde se probó la distribución de los datos a partir de análisis de correspondencia destendenciada (DCA). A partir de la DCA fue posible realizar el análisis de componentes principales (PCA).

En el PCR-DGGE, los perfiles de los amplicones obtenidos fueron analizados y comparados utilizando el programa Image Quant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA), con el objetivo de obtener una matriz de presencia y ausencia de bandas. A continuación, a partir de las matrices generadas, se realizó el análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS), en el programa WinKyst CANOCO® versión 4.5, utilizando el coeficiente de similitud de Bray-Curtys. Asociado a NMDS, las agrupaciones formadas por las comunidades microbianas fueron validadas y separadas basándose en los valores de R obtenidos a partir del análisis de similitud (ANOSIM) en el programa PAST versión 3.11.

#### **4. Resultados y Discusión**

En el experimento bajo condiciones controladas, con diferentes humedades, con adición o no de cobertura vegetal, y con aplicación o no de nitrógeno se verificaron los siguientes resultados:

A los 142 días de incubación, se verificó que la liberación de CO<sub>2</sub> aumentó con el incremento de las humedades, alcanzando el mayor valor, cerca de 27 µg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, en la humedad de 100%. Se verificó que el cociente metabólico aumentó con el incremento de las humedades, especialmente en la humedad de 100% con y sin paja. A los 205 días hubo aumento de la respiración basal con el incremento de las humedades, independientemente de la adición o no de nitrógeno, alcanzando el mayor valor, cerca de 20 µg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> con el 100% de humedad. El cociente metabólico aumentó con el incremento de la humedad, alcanzando el mayor valor, cerca de 0,12 µg CO<sub>2</sub> µg kg<sup>-1</sup> con el 100% de humedad. En ese sentido, se apreció que el agua es el factor preponderante para el aumento de la respiración del suelo y del cociente metabólico, especialmente en el tratamiento con el 100% de la capacidad de retención de agua, en ambos períodos de muestreo. Además, se notó una relación equivalente en las propiedades microbiológicas.

A los 142 días, el análisis multivariante reveló que el QCO<sub>2</sub> y la RBS, se correlacionaban entre sí, y con los tratamientos con paja y las humedades del 75 y el 100%. La variable CBM se correlacionó con el tratamiento sin paja y las humedades del 25 y 50%. La relación del qCO<sub>2</sub> con las mayores humedades (75 y 100%) puede estar relacionada con condiciones ambientales desfavorables a los grupos biológicos

del suelo presentes en estos tratamientos, a pesar de la presencia de la paja de cobertura. El análisis de la PCA reveló que a los 205 días, la RBS y el  $qCO_2$  se correlacionaron bastante con la cobertura de  $16 \text{ Mg ha}^{-1}$  y con la humedad del 100%. Además, RBS y el  $qCO_2$  se correlacionaron con la humedad al 75%. El NBM se correlacionó con la cobertura de  $16 \text{ Mg ha}^{-1}$  y con la humedad del 100%. El CBM se correlacionó con la variable sin paja y con la humedad al 50%. La variable  $C / N_{mic}$  estaba correlacionada con la humedad del 75%.

El perfil del DGGE presentó un gran número de bandas, demostrando modificaciones en las comunidades bacterianas a lo largo de los tratamientos. A los 142 días, mostró que las comunidades bacterianas presentes en los tratamientos con paja presentaron cerca del 90% de semejanza, lo que puede ser explicado por el hecho de tratarse de muestras donde hubo permanencia del residuo vegetal, que posiblemente aportó un mayor equilibrio a la comunidad microbiana de los citados tratamientos. Además, se observó un 100% de similitud entre las repeticiones de las muestras con el 50% de la capacidad de retención de agua y con una cobertura vegetal de  $16 \text{ Mg ha}^{-1}$ . A los 205 días, fue posible observar que las muestras de los tratamientos sin paja y con 75 y 100% de la capacidad de retención de agua y con nitrógeno presentaron cerca del 96% de similitud, demostrando que el factor humedad probablemente no tuvo influencia en posibles alteraciones de la comunidad bacteriana.

A los 142 días, la ordenación generada por el NMDS agrupó las réplicas de los tratamientos con paja de manera adyacente, mientras que las de los tratamientos sin paja en porciones equidistantes unos de otros. El análisis de la estructura de las comunidades de bacterias mostró que éstas fueron separadas teniendo en cuenta el factor cobertura, donde se observaron (con ANOSIM) diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los valores de  $R$  de 0,32 y 0,59 en los niveles de paja de 0 y  $16 \text{ Mg ha}^{-1}$  respectivamente. A los 205 días, la ordenación generada por el NMDS agrupó las réplicas de los tratamientos de modo contiguo, donde se observaron (con ANOSIM) diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el valor de  $R = 1$ .

En el experimento en condiciones controladas, con diferentes temperaturas, con adición o no de paja, y con aplicación o no de nitrógeno se observaron los siguientes resultados:

En las variables microbiológicas, se verificaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a los 168 días de incubación del suelo, donde se obtuvo en la variable NBM en las medias generales de los tratamientos con cobertura y con nitrógeno, los mayores valores en relación a los tratamientos sin cobertura y sin nitrógeno, respectivamente. En cuanto a la respiración del suelo, el mayor valor se observó en el tratamiento con nitrógeno  $100 \text{ kg ha}^{-1}$ , en relación al tratamiento sin nitrógeno a una temperatura de

20°C. En el análisis del desdoblamiento de la paja x temperatura x nitrógeno se observaron diferencias significativas en los tratamientos con cobertura de 8 Mg ha<sup>-1</sup> y con o sin nitrógeno, ambos a la temperatura de 20°C. Además de beneficios como la protección a la acción de agentes erosivos y el ciclo de nutrientes, la presencia de la paja garantiza confort térmico a la microbiota edáfica. En cuanto al NBM, se observó que en ausencia de nitrógeno el tratamiento con cobertura de 8 Mg ha<sup>-1</sup>, obtuvo mayores valores en relación a los tratamientos sin cobertura, y con nitrógeno 100 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente. En el análisis del desdoblamiento de la paja x temperatura x nitrógeno, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del tratamiento con paja 8 Mg ha<sup>-1</sup>, en relación al tratamiento sin paja a la temperatura de 30°C en ausencia o presencia de la fertilización con nitrógeno.

A los 76 días, el análisis de la PCA demostró que el cociente metabólico no se correlacionó con la presencia o ausencia de la cobertura vegetal. El NBM obtuvo una pequeña relación con la presencia de la paja. Este hecho puede estar relacionado con incremento de nitrógeno que la microbiota del suelo recibió de la paja. Además, la RBS, la relación C/Nmic y el CBM se correlacionaron con la ausencia de paja, obteniendo la RBS con el mayor grado de correlación. El análisis de la PCA a los 168 días de incubación, reveló que el CBM se correlacionó bastante con la presencia de la cobertura y con la temperatura de 30°C, que también estaban bastante correlacionados entre sí. La variable C/N microbiana se correlacionó mejor con la presencia del nitrógeno mientras que el NBM se correlacionó con el tratamiento con cobertura. La RBS y el qCO<sub>2</sub> se correlacionaron bastante entre sí y en ausencia de nitrógeno y cobertura vegetal a una temperatura de 20°C.

En los experimentos en condiciones de campo se obtuvieron los siguientes resultados:

En el área 1 no se constataron diferencias significativas entre los tratamientos y las profundidades estudiadas en el CBM, en el qCO<sub>2</sub>, en el C/Nmic y en la estimación del número de NITRA. En la RBS, se observaron diferencias significativas en el tratamiento sin fertilización nitrogenada en la profundidad de 0-10 cm en relación a la profundidad de 10-20 cm. En relación al NBM, se observaron diferencias significativas en el tratamiento con fertilización nitrogenada en la profundidad de 0-10 cm en relación a la profundidad de 10-20 cm. En cuanto al número más probable de microorganismos AMO, se evidenciaron diferencias significativas, con mayores números de AMO en la profundidad de 10-20 cm en relación a la profundidad de 0-10 cm, independientemente de la presencia o ausencia de la fertilización nitrogenada. En cuanto al número más probable de microorganismos NITRI se observaron diferencias significativas y se encontraron mayores valores en el tratamiento sin fertilización nitrogenada en relación

al tratamiento con fertilización nitrogenada en la profundidad de 10-20 cm, y en el tratamiento con fertilización nitrogenada en la profundidad de 0-10 cm en relación a la profundidad de 10-20 cm.

En el área 1, a través de la PCA, se observó que la relación C/N microbiana, los AMO y NITRA y el CBM se correlacionaron bastante con la profundidad de 10-20 cm y en presencia de nitrógeno, mientras que la RBS, el NBM, el  $qCO_2$  y el NITRI se correlacionaron con la profundidad de 0-10 cm y en ausencia de nitrógeno. En el área 2, se observó en la PCA que la RBS, el  $qCO_2$ , el NBM y los NITRA se correlacionaron bastante con la profundidad de 10-20 cm y en la presencia de fertilización nitrogenada, mientras que la relación C/Nmic, el CBM, y los NITRI se correlacionaron con la profundidad de 0-10 cm y en ausencia de nitrógeno.

En cuanto a los análisis de las enzimas realizadas en el Área 2, se observaron diferencias sólo en la deshidrogenasa, observándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el tratamiento sin fertilización nitrogenada, donde la profundidad de 10-20 cm presentó valor superior al encontrado en la profundidad 0-10 cm.

## **5. Conclusiones**

En condiciones controladas, con diferentes humedades, con adición o no de cobertura vegetal, y con la aplicación o no de nitrógeno, se constató que la respiración basal del suelo y el  $qCO_2$  se vieron influenciados por el incremento de las humedades, especialmente por la humedad del 100% en los dos períodos de incubación del suelo. El nitrógeno de la biomasa microbiana se correlacionó con la cobertura, independientemente de la adición de fertilización nitrogenada. El carbono de la biomasa microbiana no se vio influido por los tratamientos aplicados en el experimento realizado en ambas épocas de evaluación. El perfil de las comunidades bacterianas reveló una alta correlación de la humedad y la cobertura en posibles cambios en la composición microbiana, principalmente en la humedad del 100%.

En condiciones controladas, con diferentes temperaturas, con adición o no de cobertura, y con la aplicación o no de nitrógeno, la respiración del suelo y la relación C/N se correlacionaron con la ausencia de cobertura e se vieron influenciadas por la presencia de fertilización nitrogenada en la temperatura de 20°C. El carbono de la biomasa microbiana se vio influenciado por la presencia de cobertura y la temperatura de 30°C. De modo general, el nitrógeno de la biomasa microbiana se vio influido en primer lugar por la presencia de la cobertura y secundariamente por la fertilización nitrogenada.

En condiciones de campo, la respiración basal fue el indicador más sensible en relación al cambio en la profundidad en el área 1, mientras que el carbono de la biomasa microbiana, el cociente metabólico y los nitratores no se vieron influenciados por la aplicación de los tratamientos en las áreas estudiadas. Los nitritadores se correlacionaron con la ausencia de nitrógeno en la profundidad de 0-10 cm, mientras que los nitratores y los amonificadores se relacionaron con el tratamiento con fertilización nitrogenada en la profundidad de 10-20 cm independiente del área evaluada.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2	OBJETIVOS .....	3
2.1	Objetivo geral .....	3
2.2	Objetivos específicos .....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	Cana-de-açúcar: características, história, cultivo e manejo .....	4
3.2	Microrganismos e solo.....	6
3.2.1	Processos e organismos que participam da ciclagem do nitrogênio no solo.....	7
3.3	Métodos de análise microbiana dos solos .....	10
3.3.1	Parâmetros microbianos edáficos em cana-de-açúcar .....	12
3.3.2	Enzimas do solo em cultivos com cana-de-açúcar: protease, desidrogenase e fosfatase alcalina .....	14
3.4	Avaliação da diversidade das comunidades microbianas dos solos .....	16
3.4.1	Aplicação da técnica de PCR-DGGE em estudos da microbiota edáfica de cana-de-açúcar.....	18
3.5	Fatores ambientais que influenciam os atributos microbianos de solos agrícolas..	19
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1	Atributos microbianos e perfil de comunidades bacterianas em solo cultivado com cana-de-açúcar .....	22
4.1.1	Condução do experimento.....	22
4.1.2	Amostragem de solo.....	24
4.1.3	Parâmetros microbiológicos do solo analisados .....	24
4.1.4	Análise da comunidade bacteriana.....	25
4.1.5	Análise Estatística .....	26
4.2	Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar sob efeito da temperatura .....	28
4.2.1	Condução do experimento.....	28
4.2.2	Amostragem de solo.....	28
4.2.3	Propriedades microbiológicas do solo analisadas .....	29
4.2.4	Análise Estatística .....	29
4.3	Propriedades microbiológicas em latossolos cultivados com de cana-de-açúcar... 30	
4.3.1	Condução do experimento.....	30
4.3.2	Amostragem de solo.....	31
4.3.3	Atributos microbiológicos do solo analisados.....	31
4.3.4	Análise Estatística .....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1	Atributos microbianos e perfil de comunidades bacterianas em solo cultivado com cana-de-açúcar .....	35
5.1.1	Parâmetros microbiológicos do solo analisados .....	35
5.1.2	Análise da comunidade bacteriana.....	42
5.2	Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar sob efeito da temperatura .....	50
5.2.1	Propriedades microbiológicas do solo analisadas .....	50
5.3	Propriedades microbiológicas em latossolos cultivados com de cana-de-açúcar..	61
5.3.1	Atributos microbiológicos do solo analisados.....	61
6	CONCLUSÕES.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	72
	ANEXOS.....	88



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cana-de-açúcar configura-se em uma das expressivas culturas mundiais, sendo cultivada em vários países e destacando-se entre as *commodities* agrícolas, como importante componente ambiental e social. Ela serve de fonte para produção de álcool, açúcar e etanol, garantindo crescimento econômico e empregabilidade.

No Brasil a produção é de 684,77 milhões de toneladas, sendo a produtividade de 76.313 kg ha<sup>-1</sup> e com uma área estimada em 9 milhões de hectares, onde São Paulo destaca-se como o maior produtor. É a terceira cultura em referência a utilização de área, atrás da soja e do milho. Entretanto sua produtividade é superior às culturas supracitadas, especialmente em decorrência de sua extraordinária eficiência de conversão fotossintética.

Ante o reconhecimento que a cana-de-açúcar representa, são importantes estudos que possibilitem compreender a qualidade edáfica em áreas cultivadas com essa espécie, além de elucidar características ambientais desse agroecossistema. Uma das formas de avaliar os impactos desse sistema agrícola é a partir de atributos microbiológicos, onde dentre os existentes, ressalta-se a biomassa microbiana (BM) e a composição das comunidades de organismos do solo.

A biomassa microbiana é expressa a partir de sua atividade, pela respiração basal do solo (RBS), de seu percentual de carbono e do carbono orgânico total do solo, onde se é possível à determinação de índices que definem a dinâmica do C. A relação entre a atividade microbiana e o carbono da biomassa microbiana indica o seu quociente metabólico, onde esta razão sugere a quantidade de carbono imobilizado na biomassa microbiana. Já a relação entre carbono da biomassa microbiana e o carbono orgânico total do solo indica o quociente microbiano, que determina a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono orgânico do solo.

Estudando os efeitos do sistema de preparo do solo na atividade microbiana, Dadalto et al. (2015) observou que o sistema plantio direto apresentou menor influência na atividade microbiológica do solo. Sendo assim, estudos sobre os efeitos da presença de resíduos vegetais, além de fatores como umidade e temperatura podem auxiliar no conhecimento do comportamento da microbiota do solo.

A microbiota do solo inclui bactérias, actinomicetos, fungos, algas e microfauna de vida livre, que convivem no solo formando uma comunidade extremamente diversificada nos seus componentes (Moreira e Siqueira, 2006). Esses microrganismos controlam funções-chave no solo como a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica, além de contribuir para a estruturação e agregação do solo (Kennedy e Doran, 2002). Mudanças na composição desses grupos de organismos podem influenciar nas transformações de ciclagem biogeoquímica de nutrientes de

importância agrícola, como o nitrogênio, especialmente para os organismos associados ao ciclo do N (Bustamante et al., 2006).

Dentre as técnicas utilizadas para acessar a estrutura das comunidades bacterianas destaca-se a associação da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) com o *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis* (DGGE) onde é averiguada parte da sequência do gene rRNA 16S de bactérias, a partir da amplificação por PCR, sendo em seguida distinguida por meio de técnicas como clonagem e sequenciamento ou por eletroforese pelo DGGE.

Rachid et al. (2012), estudando o impacto de diferentes sistemas de manejo (cana crua e cana queimada) nas propriedades físico-químicas e microbiológicas em solo de Cerrado, verificou alterações significativas na estrutura de bactérias totais, nitrificantes e desnitrificantes que foram fortemente influenciadas pelo uso e manejo do solo, especialmente em área de cana queimada. Costa et al. (2014) em estudo sobre a estrutura das comunidades bacterianas associadas ao solo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, observou diferenças na composição dessas comunidades bacterianas quando comparadas à microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar.

Embora sejam importantes pesquisas sobre os atributos microbiológicos e sua relação com as comunidades de organismos do solo em cultivo de cana-de-açúcar, são escassos os trabalhos em São Paulo, Brasil. Nesse sentido, em virtude da ausência de resultados conclusivos são necessários estudos para avaliá-los.

Diante do exposto tem-se como hipótese que os fatores abióticos (palha, nitrogênio, umidade e temperatura) influenciam na atividade e estrutura das comunidades microbianas do solo cultivado com cana-de-açúcar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de fatores abióticos nos atributos microbiológicos em solos cultivados com cana-de-açúcar (*Saccharum spp*).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as modificações na atividade e estrutura da comunidade bacteriana em solo previamente cultivado com cana-de-açúcar em função da palha, da umidade e do nitrogênio;
- b) Avaliar o efeito da adição de palha, do nitrogênio e da temperatura em solo anteriormente cultivado com cana-de-açúcar na atividade e biomassa microbianas;
- c) Relacionar os atributos microbiológicos do solo com as variáveis ambientais (palha, umidade, temperatura e nitrogênio).
- d) Quantificar comunidades específicas de bactérias (amonificadores, nitrificadores, nitratores), em solo cultivado com cana-de-açúcar.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cana-de-açúcar: características, história, cultivo e manejo

A cana-de-açúcar constitui-se uma gramínea com metabolismo C4 que está inserida na família Poaceae, sendo caracterizada por uma elevada taxa líquida fotossintética e utilização eficiente da energia solar o que lhe confere alta produção de biomassa (Franco et al., 2010). Pode apresentar vários ciclos de desenvolvimento, e, portanto, classificada como uma cultura semiperene, possibilitando em média cinco cortes para, em seguida, ser realizada a reforma do canavial. Apresenta crescimento rápido, reprodução copiosa e utilização econômica de quase toda planta. Seu ciclo fenológico é formado pelas fases de brotação, perfilhamento, crescimento e maturação (Scarpari e Beauclair, 2010). Desenvolve-se em diferentes tipos de solos e sob variados climas. Apresenta como principais fatores que influenciam na produção e maturação da cultura, as condições específicas do ambiente (solo e clima), o manejo e a cultivar selecionada (Maule et al., 2001).

Essa importante espécie originou-se na região leste da Indonésia, Nova Guiné, Java e Índia, disseminando-se para várias ilhas ao sul do Oceano Pacífico, Indochina, Arquipélago da Malásia e Bengala (Fahl et al., 1998). A literatura reporta serem os persas os primeiros a estabelecerem técnicas de produção de açúcar, de modo cristalizado, conforme utilizado atualmente (Delgado e Cesar, 1977).

No Brasil o cultivo da cana-de-açúcar, decorre desde o seu descobrimento, sendo que os primeiros canaviais foram implantados a partir de mudas trazidas de outros continentes colonizadores (Ros, 2004). Ela é cultivada comercialmente em mais de 100 países e territórios, significando uma fundamental fonte econômica de emprego e renda no ambiente rural desses países. E embora essa cultura seja de impacto mundial, apenas 10 países detêm 80% da produção sendo eles: Brasil, Índia, China, México, Tailândia, Paquistão, Colômbia, Austrália, República da Indonésia e Estados Unidos (Nova Cana, 2016).

A utilização da cana-de-açúcar foi decorrente da crise energética do petróleo iniciada em 1973, acarretada pela inflação no preço do barril pelos países da OPEP, probabilidade de colapso e emergência no emprego de energia limpa e renovável (Carvalho et al., 2013). A partir deste panorama, foi proposta no Brasil a utilização de outras fontes de energia, criando assim em 1975, o Programa Nacional do Álcool (Bernardes e Câmara, 2001). No Brasil, a produção de etanol oriundo da cana-de-açúcar oferece amplas vantagens, já que o país detém de tecnologias desenvolvidas não demandando aumento na área destinada à lavoura (Carvalho et al., 2013). Além

do etanol, a referida espécie é cultivada para fins agroindustriais na produção de açúcar e álcool.

Essa cultura é produzida em dois tipos de sistemas: colheita manual (cana queimada e colheita mecanizada (cana crua). O sistema de cana queimada configura-se na eliminação da matéria seca no dossel da planta, objetivando facilitar o processo de retirada e transporte dos colmos. Entretanto esse sistema pode culminar em impactos negativos ambientais, pela eliminação da biomassa vegetal que oferece proteção ao solo, além de incrementar na emissão de gás carbônico na atmosfera, contribuindo com o efeito estufa e reduzindo o conteúdo de matéria orgânica no solo (Souza et al., 2005). Ainda, a duração da retirada dessa cobertura por extensos períodos, pode estimular o processo erosivo que desencadeará na deterioração biológica, física e química do solo pelas ações da precipitação e escoamento superficial (Valim et al., 2016). Outras consequências da queima da cana-de-açúcar são: sujeira provocada pela fuligem propagada nos centros urbanos, aumento no número acidentes nas rodovias como resultado da ausência de visibilidade provocada pela fumaça, doenças especialmente respiratórias na população, extermínio de fauna silvestre e supressão da entomofauna que controla a broca da cana-de-açúcar (Oliveira e Barrocas, 2001).

Já o sistema de cana crua consiste em triturar e cortar folhas, bainhas, ponteiros e colmos propelindo-os superficialmente ao solo, produzindo uma camada morta designada palhada (Aquino et al., 2015; Marafon et al., 2015). Nesse sistema, a permanência dos restos culturais visa o equilíbrio ao ambiente, pois propicia melhoria das propriedades físico-químicas e biológicas do solo, minimização da erosão, acréscimo e conservação da umidade, incremento no teor de matéria orgânica, mudanças de fertilidade e temperatura, elevação nos estoques de carbono e nitrogênio do solo, redução nas emissões de gases de efeito estufa e controle na incidência de flora infestante (Costa et al., 2011; Mello Ivo, 2012; Aquino et al., 2015; Marafon et al., 2015). A utilização de maquinário para efetuar a colheita além de prevenir a contaminação do meio, ocasiona aumento da eficácia e velocidade do processo. Contudo, a intensidade no uso dessas máquinas de maneira reiterada, provoca alterações na agregação do solo, gerando sua degradação estrutural e desencadeando a compactação do solo, fato comumente observado em situações de umidade demasiada (Carvalho et al., 2011; Lima et al., 2013).

### **3.2 Microrganismos e solo**

O solo situa-se na interface atmosfera-litosfera, algo que lhe atribui particularidades próprias (Korasaki et al., 2013). Consiste em uma estrutura viva, heterogênea, complexa e dinâmica (Moreira e Siqueira, 2006) onde seus processos e elementos estão ligados (Barros et al., 2010), representando um reservatório genético altamente diversificado em relação a quantidade de microrganismos da Terra, com aproximadamente 1 bilhão de pares de base (Gpb) de genomas microbianos por grama de solo (Souza et al., 2016).

Os microrganismos são cosmopolitas apresentando essa habilidade em virtude de sua diversidade metabólica, sendo capazes de utilizar um grande número de fontes energéticas e desenvolvendo-se em variados nichos presentes no meio (Tortora et al., 2012). As populações microbianas influenciam os sistemas naturais e agrícolas, estando responsáveis por uma série de mecanismos (Souza et al., 2016) como decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes em frações disponíveis às plantas (Kennedy e Doran, 2002), sendo assim considerados peças chave para o equilíbrio da biosfera (Amaral et al., 2012). Mendonza et al. (2000), destacam que ao atuarem como agentes ativos da decomposição de resíduos vegetais, utiliza-os, como fonte energética nutricional para formação e multiplicação celular. Alguns desses microrganismos também realizam a fixação biológica de nitrogênio, por meio da simbiose com raízes de plantas, promovem a solubilização de minerais, participam da supressão de doenças e atuam na estruturação e agregação do solo (Araújo e Monteiro, 2007). Além de auxiliarem na promoção do crescimento das plantas e na biorremediação (Souza et al., 2016).

Esses microrganismos desempenham a função de mediadores de processos nos solos, onde apresenta alta sensibilidade às alterações ambientais, propriedade esta não verificada em indicadores químicos ou físicos. Modificações na população e atividade microbiana podem suceder em mudanças nos atributos químicos e físicos, acarretando padrões de melhoria ou degradação do solo (Powlson et al., 1987; Balota et al., 1998; Silva et al., 2015). E assim influenciam diretamente a produtividade primária do meio (Pereira et al., 2013). Souza et al. (2012) reportam que resultados consistentes de diversos autores, demonstraram que a determinação da biomassa microbiana do solo infere mudanças edáficas mais rápidas em comparação as demais propriedades do solo.

Além da atuação e benefícios da microbiota ao ambiente solo, destaca-se a relevância da matéria orgânica do solo (MOS), que é considerada uma das principais fontes de energia e nutrientes ao sistema, capaz de manter a produtividade dos solos em geral.

A MOS compreende diferentes formas que possuem carbono orgânico sendo eles, organismos vivos e não-vivos, onde os vivos são representados por raízes de vegetais e organismos do solo e os mortos constituem os substratos vegetal e animal em decomposição, substâncias orgânicas transformadas pela ação biológica de macro-organismos e de micro-organismos do solo. Ela apresenta os seguintes nutrientes fundamentais: C (52-58%), H (3-5%), O (34-39%) e N (3- 4%), onde pode ser fracionada em liteira, fração leve, biomassa microbiana, substâncias não húmicas (biomoléculas) e substâncias húmicas (húmus estável) (Couto, 2010; Primo et al., 2011).

A MOS atua reconhecidamente nos compartimentos dos solos e em suas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo influenciada por elementos como temperatura, aeração, pH e disponibilidade hídrica e nutricional, estando condicionada também ao uso e manejo dos solos (Couto, 2010; Nascimento et al., 2010). Araújo e Monteiro (2007), reportam que o acompanhamento na avaliação da matéria orgânica do solo estabelece um importante bioindicador na qualidade do sistema.

Dentre outros benefícios gerados pela MOS, destacam-se a melhoria das condições físicas do solo e o fornecimento de energia para o crescimento microbiano (Silva e Resck, 1997; Figueiredo et al., 2008), manifestando aumento na reciclagem de nutrientes e maior CTC do solo (Paes et al., 1996; Silva et al., 2013). Estes e outros benefícios conferem à MOS um papel fundamental na indicação da qualidade do solo (Mielniczuk et al., 2003), uma vez que sua variação pode ser usada para medir a conservação dos ecossistemas naturais e a instabilidade dos agroecossistemas, sendo empregada como fundamento na estimativa de sua sustentabilidade (Kaiser et al., 1995; Perez et al., 2004; Costa et al., 2013; Carmo et al., 2014).

### **3.2.1 Processos e organismos que participam da ciclagem do nitrogênio no solo**

O nitrogênio é um componente essencial aos seres vivos, já que constitui a estrutura das moléculas de proteínas (aminoácidos, enzimas, co-enzimas, peptídeos) e dos ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico) (Cenciani, 2007; Dias, 2016). A maior parte dele encontra-se na atmosfera sob a forma de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), cerca de 78%, onde apenas bactérias que possuem o complexo enzimático nitrogenase, são capazes de convertê-lo da forma orgânica para a

inorgânica pelo processo de fixação biológica de nitrogênio e assim tornando-o disponível às plantas para ser utilizado em suas funções vitais.

No solo, esse elemento encontra-se em duas formas, sendo uma orgânica e outra inorgânica. O formato orgânico compõe a MOS, sendo detectado em abundância especialmente em sua porção proteica, estando sujeita a celeridade da mineralização. Já no inorgânico, esse nitrogênio manifesta distintos formatos nos solos, sendo detectado como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), óxido nítrico (NO), óxido nítrico ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e outras (Dias, 2016). A ciclagem do nitrogênio no solo ocorre em diferentes etapas, com a participação de diversos organismos, sendo ressaltadas a amonificação, a nitrificação, a fixação biológica de nitrogênio e a desnitrificação. No Quadro 1, estão representadas esses estágios, as mudanças e os microrganismos encarregados desse processo.

**Quadro 1** – Diagrama contendo etapas, transformações e microrganismos envolvidos na ciclagem de nitrogênio no solo.

<b>Etapas</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Microrganismos</b>
Fixação do Nitrogênio	$\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$	Bactérias diazotróficas ( <i>Actinobacteria</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Cyanobacteria</i> e <i>Proteobacteria</i> ).
Nitrificação	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	AOB – Bactérias oxidantes de amônia AOA – Arquéias oxidantes de amônia
Desnitrificação	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	Bactérias, arquéias e alguns eucariotos

Fonte: Dias, 2016.

A amonificação é realizada por um largo número de organismos denominados amonificadores que convertem o nitrogênio orgânico em nitrogênio mineral, sendo identificada como um processo de elevada redundância operacional, contudo exibido na totalidade dos locais onde existe vida. Ela acontece em situações aeróbicas e anaeróbicas, com diferentes temperaturas e diversas modificações nas propriedades físicas, químicas ou climáticas do solo. Entretanto, normalmente este processo é beneficiado em meios aeróbios, que apresentem temperaturas médias, pH neutro a superficialmente ácido ou básico, e evidentemente, boa quantidade de matéria orgânica disponível. O  $\text{NH}_4^+$  formado nesse processo percorre dois acessos no solo, ou se sujeita a alterações inorgânicas subsequentes ou é assimilado como alimento pelas plantas ou pela microbiota do solo, sendo esse processo denominado imobilização (Dias, 2016).



A nitrificação é um processo onde ocorre a oxidação aeróbica do  $\text{NH}_4^+$  que não foi incorporado como nutriente ao solo, sendo transformado em  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{NO}_3^-$  e realizado por organismos oxidantes de amônia como bactérias (AOB) e arqueias (AOA), ocorrendo em dois estágios: nitritação, em que o  $\text{NH}_4^+$  é oxidado a  $\text{NO}_2^-$  e nitratação, onde o  $\text{NO}_2^-$  é oxidado a  $\text{NO}_3^-$  (Moreira e Siqueira, 2006; Almeida et al., 2015; Dias, 2016). A oxidação da  $\text{NH}_4^+$  é vista como uma fase restritiva da velocidade da nitrificação na maior parte dos ambientes, já que o nitrito pouco se concentra no ambiente, sendo que a nitratação acontece mais velozmente do que a nitritação, inviabilizando que o nitrito fique retido ao solo. A nitrificação ocorre em locais com abundante requerimento de oxigênio, nomeadamente nas camadas mais externas dos solos, e principalmente em terrenos pouco argilosos. As condições ótimas necessárias para a ocorrência desse processo são temperaturas entre 25 e 30°C, e pH entre 6,6 e 8,0 (Dias, 2016).

A desnitrificação é o processo de retorno do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ , realizado por microrganismos identificados desnitrificadores tais como bactérias, arqueias e eucariotos, sendo, contudo, pertencentes em sua maioria ao filo Proteobacteria, onde estão presentes as bactérias anaeróbicas facultativas e que representam cerca de 0,1 a 5% do conjunto bacteriano edáfico (Moreira e Siqueira, 2006; Almeida et al., 2015; Dias, 2016). Essa etapa consiste de um processo respiratório em que  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{N}_2\text{O}$ , continuamente, são usados por grupos microbianos como aceptores finais de elétrons através do fluxo respiratório gerando  $\text{N}_2$  (Dias, 2016). Esse processo é beneficiado por situações de restrição de carbono, onde o  $\text{N}_2\text{O}$  é lançado para o solo e para a atmosfera (Almeida et al., 2015). Esse gás apresenta um potencial de aquecimento 296 vezes superior ao  $\text{CO}_2$ , sendo esse meio a maior razão de redução de N na agricultura (Dias, 2016).

### 3.3 Métodos de análise microbiana dos solos

As metodologias utilizadas na microbiologia do solo visam estimar a quantidade e atividade das comunidades microbianas e entre essas elencam-se a biomassa microbiana, a respiração do solo, os quocientes metabólico e microbiano e a relação C/N microbiana.

A biomassa microbiana (BM) compreende todos os organismos do solo com um volume menor que aproximadamente  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  como bactérias, actinomicetos, fungos, microfauna e algas (Karam et al., 2015). Constituindo-se a parte viva do solo capaz de regular papéis chave e realizar transformações bioquímicas como decomposição, reserva de matéria orgânica, aporte e ciclagem de elementos (Gregorich et al., 1994; Araújo e Monteiro, 2007, 2012; Bailey et al., 2002; Brandão-Junior et al., 2008; Monquero et al., 2012; Azar et al., 2013; Amaral et al., 2012) e atuando também como bioindicador às alterações climáticas (Gou et al., 2015). Dessa forma, grande quantidade de BM pode garantir ao solo elevado estoque nutricional, propiciando excelente reciclagem ao longo do tempo, além de ser um indicador mais sensível de acréscimo ou diminuição na dimensão total da MOS, isso em virtude de sua constituição e rápida transformação em torno de dois anos (Monquero et al., 2012; Silva et al., 2016).

Entre os nutrientes que mais limitam o crescimento e atividade da BM destacam-se o carbono e o nitrogênio microbianos, porções lábeis do solo. O carbono da biomassa microbiana (CBM), tem sido avaliado para quantificar o tamanho do reservatório ativo e dinâmico de matéria orgânica do solo (Silva et al., 2016), onde seus valores são variáveis e dependentes do ambiente onde estiverem expostos. O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) apresenta o N prontamente mineralizável, e assim quanto maior for o seu teor mais acelerado será a sua ciclagem (Perez et al., 2005), sendo o período para que esteja livre no meio é dez vezes superior em relação ao material vegetal em transformação (Coser et al., 2007). Sousa et al. (2015) indicam uma diminuição significativa nos compartimentos de carbono e nitrogênio microbiano em áreas agrícolas ou desmatadas em comparação às áreas cobertas com vegetação nativa.

A BM apresenta métodos de avaliação diretos e indiretos, capazes de estimar a atividade da microbiota do solo. Quanto aos métodos diretos, pode-se citar a microscopia, que investiga integrantes presentes nas comunidades microbianas (fungos e bactérias). Já os métodos indiretos são a fumigação-extração, fumigação-

incubação e a respiração induzida pelo substrato (Anderson e Domsch, 1978, 2010; Araújo e Monteiro, 2007; Bailey et al., 2002; Nielsen e Winding, 2002). Ainda, existem métodos que utilizam a radiação de micro-ondas para estimar os organismos do solo, a partir da eliminação desses, são eles a irradiação-extração e a irradiação-incubação (Ferreira et al., 1999; Araújo e Monteiro, 2007).

Dentre as técnicas utilizadas na avaliação da atividade microbiana, a respiração basal do solo (RBS) é a mais utilizada, estando relacionada principalmente com o teor de matéria orgânica e com a biomassa microbiana (Alef, 1995). Dessa forma configura-se uma importante ferramenta para comparar diferentes sistemas agrícolas (Amaral et al., 2011; 2012). A RBS apresenta alta variabilidade e depende especialmente de fatores abióticos como umidade e temperatura e da disponibilidade de substrato (Brookes, 1995; Manzoni et al., 2012; Spohn e Chodak, 2015). Trata-se de um indicador genérico, que envolve a atividade de comunidades microbianas e proporciona alta reprodutibilidade (Braga et al., 2014), onde elevados valores podem sinalizar distúrbio ecológico ou grande produção do biosistema solo (Islam e Weil, 1998; 2000).

A RBS se dá pela oxidação biológica da matéria orgânica a  $\text{CO}_2$  pelos microrganismos aeróbios, o que a determina como um fator chave no ciclo do C no ambiente terrestre (Alef, 1995). Representa uma importante fonte de  $\text{CO}_2$  na biosfera, já que é o segundo maior fluxo após a produtividade primária bruta no ciclo global do carbono (C), contribuindo de 20 a 40% de entrada anual de C atmosférico (Schlesinger e Andrews, 2000). Para Araújo e Monteiro (2006), a respiração microbiana diminui ao longo do perfil do solo, correlacionando-se com o teor de matéria orgânica, além de outros atributos microbiológicos.

Outro indicador bastante representativo e importante nas avaliações edáficas é o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) ou respiratório, que concerne da razão entre o carbono microbiano e respiração basal do solo. Esse atributo ecofisiológico é importante para aferir o funcionamento biológico, indicando a capacidade da BM em aproveitar o carbono livre para biogênese e sendo dependente das características do substrato (Sousa et al., 2014). Esse índice analisa a ação proveniente de perturbação ambiental ou antropogênica sobre a atividade microbiana (Anderson e Domsch, 1993; Zhang et al., 2011; Diniz et al., 2014; Santos e Maia, 2013). Gama-Rodrigues (2008), versa que sistemas com baixas taxas de  $q\text{CO}_2$  devem ser preponderantes, uma vez que, nesses a BM encontra-se estável e deste modo ocorrerá redução na liberação de  $\text{CO}_2$  pela respiração, e, dessa forma, incrementará o aporte de C à biomassa microbiana. Entretanto altas quantidades refletem biogeocenoses jovens, sujeitas a certa circunstância de estresse, e, assim, possibilitando aumento no consumo energético

para sobrevivência das populações microbianas (Anderson e Domsch, 2010; Santos e Maia, 2013).

Além do  $qCO_2$ , destaca-se o quociente microbiano ( $qMic$ ) que é oriundo da relação entre o carbono microbiano e o carbono orgânico total do solo. Esse índice em situações normais encontra-se na faixa de 1-4% (Cunha et al., 2011), sendo caracterizado como indicador de sustentabilidade de ecossistemas (Azar et al., 2013). Ele revela o carbono disponível para o desenvolvimento microbiano (Nicodemo, 2009), demonstrando a eficácia da BM em utilizar o carbono orgânico total do solo e assim viabilizando informações sobre a atividade da MOS (Anderson e Domsch, 1993; Cunha et al., 2011; Pragma et al., 2012). Em outras palavras, conforme Tótolá e Chaer (2002) o  $qMic$  informa se o teor de C está estabilizado ou alterando-se segundo as circunstâncias do meio. Nicodemo (2009), ressalta que valores elevados podem ser observados em solos de aptidão superior, sendo que maiores valores de  $qMic$  retratam aumento da reciclagem de nutrientes, devido a abundância de C na microbiota, em relação ao carbono orgânico total (Pragma et al., 2012). Já valores baixos no  $qMic$ , refletem alguma condição estressante das populações microbianas, que pode ser decorrente de distúrbios antropogênicos ou ambientais como diminuição da quantidade e qualidade do substrato orgânico, deficiências nutricionais, alterações no pH ou presença de poluentes (Cunha et al., 2011; Sousa et al., 2015), implicando em redução na habilidade de aproveitamento do carbono (Wardle, 1994).

A relação C/N microbiana é empregada na avaliação da habilidade de mineralização da MO (Nicodemo, 2009), propiciando caracterizar a estrutura e o estado dos grupos microbianos ou como um possível indicador de mudança no ambiente. Essa razão pode ser influenciada por fatores ambientais naturais ou relativo ao uso e manejo do solo, tais como temperatura, umidade, pH, textura e disponibilidade de C e N na biomassa dos microrganismos ( $qMic$ ), incorporação de nitrogênio por fungos do solo e fração na disposição da microbiota em número e diversidade (Sousa et al., 2015).

### **3.3.1 Parâmetros microbianos edáficos em cana-de-açúcar**

A avaliação das propriedades microbianas do solo são um instrumento fundamental no monitoramento da qualidade edáfica, onde mudanças decorrentes das práticas agrícolas são facilmente detectáveis. Cultivos intensivos de manejo e utilização do solo, como por exemplo o sistema de cana queimada, tendem a impactar negativamente o ambiente. Paredes Júnior et al. (2015), analisando o impacto dos cultivos de cana-de-açúcar em sistemas com e sem queima da palhada nas propriedades microbiológicas em Dourados-MS observaram que o sistema com

queima apresentou elevados índices de  $qCO_2$  nas camadas mais superficiais de 0-5 e 5-10 cm, sendo expressivamente superiores aos constatados no sistema sem queima. Conforme os autores, este resultado demonstra maior desordem no meio onde houve a prática da queima, já que esse ato causa desequilíbrio no sistema e ocasiona estado de estresse na biomassa microbiana do solo, gerando baixa assimilação de C aos tecidos microbianos.

Evangelista et al. (2013), avaliando os atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar manejada sob cultivos orgânico e convencional em Goiás verificaram que o sistema convencional com queima exibiu os maiores valores de respiração e quociente metabólico apontando condição de extenuação no ecossistema solo. Já Borges et al. (2014), estudando o efeito dos cultivos de cana-de-açúcar em sistemas orgânico e convencional nos atributos microbiológicos em Latossolos no Cerrado do Brasil, verificaram que o sistema de cultivo convencional com queima obteve menor eficiência no uso do carbono como energia, apresentando elevado  $qCO_2$  e implicando em saídas de C- $CO_2$  para a atmosfera.

Em sistemas de cultivo sem queima e/ou com deposição da palhada sobre o solo, percebe-se incrementos satisfatórios nos parâmetros microbiológicos edáficos, assim melhorando a qualidade do solo e diminuindo seu esgotamento (Oliveira et al., 2014). Além de possibilitar proteção ao meio, já que de acordo com Paredes Júnior et al. (2014) a existência dos resíduos vegetais minimizam a incidência solar, auxiliando na conservação e estabilidade da umidade e microclima, garantindo assim equilíbrio a holocenose. Paredes Júnior et al. (2015), constataram que o sistema sem queima da cana-de-açúcar indicou os maiores valores para o carbono da biomassa microbiana do solo em comparação ao tratamento com queima na camada mais superficial (0 – 5 cm), revelando que situações favoráveis para o crescimento microbiano verificados no sistema de cana crua geram benefícios como adição de C à BM. Borges et al. (2014), reportaram que a substituição do sistema de cultivo convencional pelo sistema de cultivo orgânico recuperou os teores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, o que propiciou melhorias na ciclagem de nutrientes da biomassa microbiana, observado pelo quociente microbiano.

Em seu estudo Oliveira et al. (2014), compilou informações sobre o manejo da colheita da cana-de-açúcar (crua e queimada) e as mudanças nos atributos de solos de tabuleiro, reportando que pesquisas geralmente de breve duração, não informariam resultados contundentes aos atributos do solo com a alteração do método de colheita. Sendo possível que a concentração de palhada à um período prolongado ocasione modificações no sistema de manejo da cultura, com lenta e sucessiva diminuição da demanda de adubação química e conservação e incremento da fertilidade do solo.

Em trabalho avaliando três sistemas de cana-de-açúcar, sendo um de cana queimada e dois de cana crua, um com 5 e outro com 10 anos de implantação, Tavares et al. (2015), constataram aumento de CO<sub>2</sub> e CBM na área com 10 anos e diminuição na área com cana queimada, sendo observadas maiores emissões de CO<sub>2</sub> e atividade microbiana no verão. Esses autores também verificaram que os quocientes metabólico e microbiano mostraram maior estabilidade nas populações microbianas da área com 10 anos, propiciada especialmente pela maior deposição de palhada de cana-de-açúcar ao solo.

### **3.3.2 Enzimas do solo em cultivos com cana-de-açúcar: protease, desidrogenase e fosfatase alcalina**

As enzimas do solo atuam como bioindicadoras de perturbações nos agroambientes, contribuindo no monitoramento de possíveis impactos provocados por práticas agrícolas inadequadas. Além de monitorar, a atividade enzimática pode auxiliar no encaminhamento e elaboração de proposta quanto a análise das técnicas de manejo adotadas (Ferreira et al., 2017). As enzimas são também mais eficientes como indicadores do que os micro-organismos já que menos de 1% dos grupos microbianos podem ser isolados do solo (Purcena et al., 2014). Elas participam dos processos de decomposição e mineralização de nutrientes, atuando na disponibilização desses às plantas e na sua reciclagem. Dentre elas destacam-se a protease, desidrogenase e fosfatase alcalina.

As proteases são geradas por uma ampla faixa de organismos como bactérias e fungos e apresenta normalmente uma elevada particularidade de substrato, deteriorando preponderantemente as proteínas não estruturais. A ação da protease do solo está relacionada com a oferta de carbono e nitrogênio e a liberação do CO<sub>2</sub> (Oliveira et al., 2015). Em trabalho sobre a influência do manejo do solo sobre a atividade da protease, Oliveira e Caramori (2016), verificaram que o maior desempenho da referida enzima em áreas cultivadas com cana-de-açúcar pode ter ocorrido em função da utilização de resíduos como a vinhaça.

A atividade da desidrogenase envolve a ação de células microbianas vivas, refletindo assim o desenvolvimento da microbiota do solo (Ralte et al., 2005; Tan et al., 2008). Em estudo sobre os efeitos do manejo da cana-de-açúcar cultivada no Brasil quanto a atividade e estrutura das comunidades microbianas do solo, Pupin e Nahas (2011) destacaram que a atividade da desidrogenase pode estar envolvida nos processos respiratórios microbianos e deste modo, a redução na produção de CO<sub>2</sub> durante os vários estágios de colheita da cana-de-açúcar pode estar relacionada aos fatores abióticos do solo envolvidos no crescimento e atividade microbiana. Ainda, a

atividade da desidrogenase diminuiu nos sucessivos cortes da cana-de-açúcar, correlacionando-se com as contagens de micro-organismos e da biomassa microbiana.

A fosfatase alcalina é uma fosfomonoesterase essencialmente produzida por fontes microbianas, especialmente pelas bactérias. Essa enzima é responsável pela modificação do fósforo orgânico em inorgânico, forma capaz de ser assimilada pelos vegetais. Desse modo, exerce uma relevante função na ciclagem de nutrientes, nutrição vegetal e mineralização, já que uma ampla dimensão do fósforo existente no solo encontra-se no estado orgânico, onde após sua conversão através da hidrólise enzimática, se torna livre (Heluany, 2014; Purcena, 2014; Purcena et al., 2014). As fosfatases por estarem envolvidas no ciclo do fósforo são fundamentais para a fertilidade do solo, assim a manutenção, preservação e compreensão do comportamento e fatores que afetam essas enzimas no solo são imprescindíveis para assegurar a qualidade do solo, o crescimento das plantas e a produtividade agrícola (Purcena et al., 2014).

Em estudo sobre os efeitos dos manejos convencional (MC) e orgânico (MO) em áreas cultivadas com cana-de-açúcar e comparando-as aos resultados de uma área preservada de Cerrado (SN), Purcena et al. (2014), observaram que a prática empregada no cultivo da cana de açúcar não afetou a atividade da fosfatase alcalina. Os referidos autores destacam que a presença da fosfatase alcalina em solos ácidos, como é o caso típico dos solos de Cerrado, é especialmente composta de células microbianas que sofreram lise e de pequenos animais, onde essas enzimas tiveram sua atividade protegida, a partir da adsorção em argila ou outro elemento sólido do solo. Ainda, a baixa atividade da fosfatase alcalina quando comparada a fosfatase ácida, é decorrente da ação do pH, já que o pH das amostras de solo era ácido. Consequentemente a expressão microbiana da fosfatase alcalina não será viável como bioindicadora de qualidade do solo em solos ácidos (Purcena et al., 2014).

### **3.4 Avaliação da diversidade das comunidades microbianas dos solos**

O termo diversidade biológica engloba o número (riqueza) e a abundância relativa (equitabilidade) sendo expressa por índices como Shannon-Weaver ( $H'$ ) e Pielou ( $J'$ ) que mensuram a distribuição e quantidade de espécies. Apresenta na microbiologia a conceituação de número variado de espécies em uma comunidade de um meio específico, e em ecologia molecular, como o número de sequências de DNA diferentes existentes no DNA total extraído de uma comunidade, de determinado ambiente (Lambais et al., 2005). Entretanto, em virtude de ausência consensual na definição de espécie microbiana, essa é substituída por biótipos (unidades taxonômicas operacionais - UTOs) que são estabelecidas segundo propriedades específicas (Lambais et al., 2005) e utilizadas para confrontar populações e comunidades (Torsvik et al., 1998). Logo, a composição da comunidade microbiana envolve a presença de dados sobre a abundância de indivíduos dos diversos táxons e sua disposição relativa na sociedade (Lambais et al., 2005).

A diversidade das comunidades microbianas no solo e o seu funcionamento são importantes para o entendimento dos processos no sistema solo-planta-atmosfera. O conhecimento da heterogeneidade microbiana é fundamental pois: maximiza o entendimento dos fatores da variedade genética de um grupo, fornece compreensão sobre os modelos de organização dos microrganismos, acrescenta informações do conhecimento da função dessa biodiversidade e compreende os ajustes e a ligação da diversidade no desenvolvimento e sustentabilidade de holocenoses (Lambais et al., 2005; Ovreas, 2000).

Estudos mostram que os microrganismos do solo respondem de maneira mais rápida às mudanças decorrentes do uso e manejo aplicados ao solo. Isso porque os microrganismos apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica e funcional resultando em propriedades como abundância e atividades bioquímica e metabólica, garantindo alta performance reativa nesse ambiente (Moreira e Siqueira, 2006) e favorecendo por exemplo a sua utilização na avaliação da qualidade do solo (Six et al., 2006; Chavéz et al., 2011).

Estimativas apontam que na vasta heterogeneidade do solo a uma riqueza de  $10^6$  a  $10^7$  espécies de microrganismos por grama de solo, dentre os quais cerca de 1% são cultivados em laboratório (Omori, 2014) e preenchendo aproximadamente 0,5% do espaço poroso do solo (Moreira e Siqueira, 2006). Nesse complexo ecossistema, é possível verificar em torno de 50.000 espécies de bactérias, encontradas em uma



amostra de solo, sendo assim pesquisas sobre a diversidade microbiana são uma etapa essencial na avaliação das condições do solo, em virtude de sua relevância na ciclagem biogeoquímica, por conseguinte, no rendimento das culturas (Pisa et al., 2011).

Alguns entraves nas pesquisas sobre a diversidade microbiana são verificados em consequência dos tamanhos minúsculos do material de análise, exposições taxonômicas inacabadas e ausência de meios de isolamento e cultivo adequados para grande parte dos microrganismos. Dificuldades como a porção do desenvolvimento bacteriano em placa aferido pelas Unidades Formadoras de Colônia (UFC) que são variáveis de 0,1 a 1% em solo prístino e 10% em solo agrícola. E assim estudos fundamentados somente em isolamento bacteriano podem fornecer uma parcela pequena da diversidade bacteriana total. Pesquisas da fração não cultivável foram possíveis mediante os avanços de métodos moleculares por meio da extração, amplificação e análise de sequências de DNA direto dos solos, não condicionados ao isolamento e cultivo dos microrganismos (Torsvik et al., 1998).

A extração de DNA do solo abrange sobretudo o rompimento das células microbianas da amostra, ou seja, este DNA inclui cromossomos de um grande número de microrganismos. Assim, quanto mais variedade microbiana no solo, maior será a abundância de sequências diversas de DNA detectadas nos cromossomos microbianos. Em seguida, passos adicionais de purificação possibilitam retirar compostos interferentes como ácidos húmicos, que constantemente ocasionam degradação e diminuição da quantidade do DNA extraído (Batista, 2007).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) multiplica moléculas de DNA por mais de um bilhão de vezes, e assim propicia que pequenas e específicas porções do genoma microbiano possam ser utilizadas em análises posteriores. Basicamente o método consiste no tratamento da molécula de DNA a temperaturas distintas em vários ciclos de desnaturação do DNA alvo, anelamento dos primers (iniciadores) a sequências homólogas e seguido de extensão dos iniciadores pela atuação de uma enzima DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase (Batista, 2007), isolada primariamente da bactéria *Thermus aquaticus*.

Métodos moleculares que utilizam os produtos amplificados da PCR como o Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP), a Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), o Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP), o Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), a Análise do Espaço Ribossomal Intergênico (RISA), a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante, (DGGE), a Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura (TGGE), a Conformação de Polimorfismo em Fita Simples (SSCP) e

Análise dos Perfis Eletroforéticos de Fragmentos de Restrição (ARDRA) (Torsvik e Øvreas, 2002), são capazes de avaliar a diversidade das comunidades microbianas e diante disso têm sido utilizados com o objetivo de alcançar um maior número de grupos, avaliando melhor a estrutura daquelas.

#### **3.4.1 Aplicação da técnica de PCR-DGGE em estudos da microbiota edáfica de cana-de-açúcar**

A análise da estrutura das bactérias por meio de técnicas moleculares pode ser feita a partir da investigação de parte da seqüência do gene rRNA 16S de bactérias, a qual é amplificada por PCR (Polimerase Chain Reaction), e posteriormente pode ser caracterizada através de clonagem e seqüenciamento ou por eletroforese, por meio de técnicas como o DGGE (Denaturing Gradiente Gel Eletrophoresis), que separa fragmentos de DNA com o mesmo comprimento mas com seqüências de nucleotídeos diferentes (Brons e Van Elsas, 2008), possibilitando comparar várias amostras ao mesmo tempo, distinguir grupos de uma mesma amostra ou individualizar sujeitos da mesma espécie (Muyzer et al., 1993; Muyzer e Smalla, 1998; Smalla et al., 2007; Duarte et al., 2012; Foshtomi et al., 2015).

O método do DGGE, foi elaborado por Fisher e Lerman em 1983 e constitui-se em distintas características de desnaturação exibida pelas fitas duplas de rDNA quando sujeitas a um gel de poliacrilamida que apresenta um gradiente desnaturante crescente formado de uréia e formamida. Essa reação de desnaturação é excessivamente sujeita a seqüência e possibilita a acuidade de fragmentos de rDNA com mínimas ou apenas uma alteração nos pares de base (Batista, 2007). Na reação de amplificação são utilizados iniciadores que flanqueiam regiões altamente variáveis nos segmentos de rDNA, onde um desses iniciadores apresenta um grampo rico em guanina e citosina (G + C), fundamental para a separação dos segmentos amplificados (amplicons) no gel com gradiente desnaturante. Esses amplicons formados possuem mesma dimensão, embora contenham disparidade quanto ao seu conteúdo de G + C, sendo que o arranjo de nucleotídeos desses amplicons gera o padrão de migração no gel que é guiado também pelas interações entre os nucleotídeos da molécula de rDNA (Lambais et al., 2005).

Essa técnica mostra-se uma ferramenta útil para acessar a diversidade microbiana e o seu monitoramento e comportamento no ambiente do solo de acordo com os diferentes usos da terra (Kirk et al., 2004) e especialmente, quando utilizadas de forma complementar, permitem a avaliação da estrutura e composição dos consórcios microbianos no ambiente, revelando mudanças nas estruturas das comunidades de acordo com a mudança das condições ambientais (Ascher et al.,

2010; Dini-Andreote et al., 2010). De acordo com Van Elsas et al. (1998) a vantagem desse método em comparação com outros de *fingerprinting* é o aparecimento ou supressão de bandas como resultado de uma perturbação ambiental, propiciando assim verificar o equilíbrio e a dinâmica dos grupos bacterianos.

A análise estatística dos perfis de bandas geradas pelo DGGE é demonstrada por meio de índices de similaridade entre amostras diferentes e suas cópias (Batista, 2007; Ascher et al., 2010; Francioli et al., 2014), no qual o número e a intensidade das bandas também são aplicados na avaliação da estrutura populacional, constituindo-se como indicador de comunidades predominantes ou significativas na amostra do ambiente pesquisado (Heuer et al., 2001), além da identidade filogenética desses grupos (Ascher et al., 2010).

Em áreas cultivadas com cana-de-açúcar, embora ocorra elevada biodiversidade microbiana, somente parte dessa é conhecida e consegue ser cultivada, indicando a restrição das técnicas tradicionais nos estudos da diversidade microbiológica em agroecossistemas. Nesse certame, métodos que independem de cultivo têm possibilitado o entendimento múltiplo da microbiota edáfica (Costa et al., 2014).

Por meio da utilização da técnica PCR-DGGE, Ruppel et al. (2007) puderam observar mudança na estrutura da comunidade bacteriana em solo com adubação nitrogenada, em relação ao solo onde não foi aplicado o fertilizante. Moraes (2008), avaliando a diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar com diferentes doses de N, observou que houve alteração na estrutura das comunidades bacterianas do solo, determinadas por PCR-DGGE, entretanto, a adubação nitrogenada não alterou a diversidade de bactérias oxidadoras de amônio (AOB) no solo. Pires et al. (2011), estudando o impacto de diferentes níveis (100, 50 e 0 %) de palhada de cana-de-açúcar sobre a comunidade bacteriana total, observaram que a ausência da palhada de cana-de-açúcar não influenciou no perfil da comunidade microbiana. Entretanto, alterações significativas desses grupos microbianos foram verificadas nos tratamentos avaliados, em relação a uma área de Cerrado Nativo próximo ao experimento citado.

### **3.5 Fatores ambientais que influenciam os atributos microbianos de solos agrícolas**

A composição e atividade das populações microbianas do solo, podem ser afetadas pelo manejo e uso da terra, como efeito de alterações provocadas por fatores como adubação nitrogenada e aporte de nutrientes, cobertura vegetal, umidade e

temperatura. Assim o conhecimento da atuação desses elementos é primordial para o equilíbrio estrutural e funcional dos agroecossistemas.

Entre as práticas agrícolas, a fertilização nitrogenada pode modificar os atributos microbiológicos do solo, onde doses balanceadas de nitrogênio alteram o CBM, a RBS e o  $qCO_2$ , já quantidades escassas ou abundantes não comprometem a intensificação microbiana, sendo influenciada pelas fases do crescimento vegetal. Assim, antes do florescimento é provável que a dose de 50 kg de N  $h^{-1}$  seja bastante para alterar substancialmente o CBM do solo. Entretanto altas concentrações de nitrogênio na solução do solo podem provocar a morte celular microbiana, levando a uma composição microbiana jovem, que oferece maior atividade metabólica em comparação a grupos mais velhos, refletindo em menores valores de CBM e maiores taxas de  $qCO_2$  e assim indicando baixa eficiência metabólica. Todavia no florescimento valores entre 100 e 150 kg N  $h^{-1}$  aumentam o CBM, permitindo incremento no crescimento microbiano e beneficiando a incorporação de N pela microbiota (Ramos et al., 2010). Sendo assim, é imprescindível assegurar a apropriada utilização desse fertilizante, a fim de favorecer a sustentabilidade ambiental na produção agrícola (Joris et al., 2014), evitando acentuar a emissão de gases de efeito estufa (GEE) como o  $N_2O$ , frequentemente associado a áreas cultivadas com uso de insumos a base de N.

Outro elemento que interfere no desenvolvimento microbiano é a cobertura vegetal, já que propicia proteção a microbiota edáfica, minimizando a incidência de radiação solar e das fontes hídricas. Nesse sentido, em sistemas agrícolas onde a manutenção de resíduo vegetal como a palhada por exemplo, verifica-se elevação nos teores de MOS, sendo essa condicionada as circunstâncias pedoambientais que comprometem os níveis de humificação e decomposição (Mazurana et al., 2013), além disso a presença dessa palhada favorece no decaimento das oscilações de temperatura e umidade do solo no decorrer do dia. Essa adição de compostos orgânicos no solo está relacionado ao incremento da agregação das partículas do solo, que preservam fisicamente a matéria orgânica, já que constroem uma barreira que impede o ataque dos microrganismos do substrato e assim intervêm na ciclagem da BM (Monquero et al., 2012). O acréscimo ou retirada de material vegetal do solo pode acarretar mudanças na biomassa microbiana, a partir do incremento de  $CO_2$  gerado e assim possibilitando, sua utilização como referência para monitorar alterações na dinâmica do carbono do solo (Correia et al., 2015). Segundo Tavares (2014), estudando três sistemas de cana-de-açúcar, sendo um de cana queimada e dois de cana crua, onde um possuía 5 e outro 10 anos de implantação, verificou que houve maior emissão de  $CO_2$  na área com 10 anos, onde esse incremento na

atividade microbiana pode estar associado a quantidade de resíduos vegetais depositados sobre o solo, que favoreceram a atividade microbiana a liberar mais CO<sub>2</sub> em função das condições favoráveis de umidade e temperatura do solo.

A atuação adequada de fatores abióticos como umidade e temperatura também são primordiais para o desenvolvimento microbiano em solos agrícolas. Assim, mudanças no ambiente provocados por estes aspectos têm promovido alterações na formação das comunidades microbianas (Brockett et al., 2012), revelando por exemplo que a disponibilidade de água no solo é determinante na composição dos grupos bacterianos e fúngicos, onde a biomassa bacteriana reduz com o aumento da saturação de água no solo (Ma et al., 2015). A dimensão no preenchimento dos poros por água relaciona-se com o carbono livre e também com a capacidade de mineralização, expressando o influxo da umidade na atividade microbiana e decorrente liberação de CO<sub>2</sub> (Tavares, 2014). Já a temperatura compromete a intensificação microbiana, sendo que seu arranjo e desempenho é maior entre 28-32°C, diminuindo em valores menores de 25° e máximos de 35°C (Moreira e Siqueira, 2006). Na atuação como decompositores, os microrganismos desenvolvem-se em temperaturas na faixa de 35-40° (Brady e Weil, 2013). A temperatura do solo também pode estimular a emissão de CO<sub>2</sub>, entretanto deve ser analisada com cuidado, visto que ela está intimamente relacionada com a umidade do solo, sendo este tipo de avaliação descrita por diferentes autores, que salientam por exemplo, que em mudanças pequenas de temperatura, a umidade do solo torna-se mais precisa no estabelecimento de alterações da respiração do solo (Tavares, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de laboratório e análises químicas e microbiológicas foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e Fertilidade do Solo do Centro de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas, SP. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) em Piracicaba, SP.

### Parte I: Amostragem de solo em experimento sob condições controladas

#### 4.1 Atributos microbianos e perfil de comunidades bacterianas em solo cultivado com cana-de-açúcar

##### 4.1.1 Preparação do solo e da palhada

A camada de solo coletada, foi de 0-20 cm de um cultivo de cana-de-açúcar, presente na Estação Experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) localizada em Piracicaba, São Paulo. A referida cultura vem sendo cultivada nessa área por aproximadamente 10 anos. O solo da área foi considerado de textura muito argilosa, apresentando 658, 123 e 219 g kg<sup>-1</sup> de argila, silte e areia, simultaneamente, segundo Camargo et al. (2009), a partir do método da pipeta. A palhada de cana-de-açúcar foi coletada no mesmo local da amostragem do solo, onde foram utilizadas folhas em fase de senescência de plantas da variedade SP 81-3250 e permanecendo em campo aquelas que se encontravam em contato com o solo. A palhada foi seca ao ar, sendo seu tamanho homogeneizado (2 – 5 cm), simulando o processo de picagem da palhada durante a colheita mecânica (Vargas et al., 2014a). As amostras de solo (Tabela 1), bem como de palha (Tabela 2) foram analisadas quimicamente conforme recomendações de Raij et al. (2001). As quantidades de C e N total do solo foram determinadas por meio de analisador elementar Vario EL. A matéria orgânica (MO) foi determinada por fotometria. O pH foi avaliado potenciométricamente em solução em CaCl<sub>2</sub> (0,01 mol L<sup>-1</sup>). Os elementos fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos através do método da resina trocadora de íons e o H+Al (acidez potencial) por meio de solução tampão SMP. A capacidade de troca catiônica (CTC) foi calculada por meio da soma de bases, acrescido de H+Al. A saturação por bases (V) foi calculada a partir da relação percentual entre a soma de bases e a CTC (Vargas et al., 2014a).

A relação C/N do solo e da palha foram respectivamente de 15,7 e 112. Esse solo foi selecionado em função de seu valor de pH (5,2) e também por não existir ocorrência de utilização de calcário nos três anos anteriores ao da amostragem. Em

seguida, o solo foi previamente seco ao ar e peneirado em malha de 2 mm (Vargas et al., 2014b).

**Tabela 1** - Resultado da análise química de terra antes da implantação do experimento.

pH	C	N	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
	—g/Kg—	g/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>		—mmolc/dm <sup>3</sup> —					%
5,2	16,8	1,1	26,0	16,0	2,5	27	9,0	34	72,4	53

Fonte: Vargas et al. (2014b)

**Tabela 2** - Resultado da análise química da palhada antes da implantação do experimento.

C	N	P	K	Ca	Mg
—g/Kg—					
450	4,0	0,2	1,5	3,9	1,3

Fonte: Vargas et al. (2014b)

#### 4.1.2 Condução do experimento

Foi realizada uma incubação de solo, onde amostras de solo com diferentes umidades (100, 75, 50 e 25% da capacidade de retenção de água - CRA) e duas quantidades de palha (0 e 16 Mg MS ha<sup>-1</sup>) foram acondicionadas em recipientes feitos com tubos de PVC com 0,15 m de diâmetro e contendo 4,55 kg de solo, por um período de 205 dias. Inicialmente essas colunas permaneceram por 127 dias até a estabilização da umidade de 25% da CRA. Durante o primeiro mês de incubação, os tubos receberam água simulando chuvas de 10 mm para não limitar a atividade microbiana, promover a decomposição parcial da palha e manifestação desta sobre o solo. As colunas continham na parte superior uma película plástica perfurada para limitar a excessiva evaporação de água (Vargas et al., 2014b).

Em seguida, a quantidade de água foi acertada mediante a umidade avaliada, sendo as colunas incubadas por mais 15 dias. Posteriormente foi instalado um experimento fatorial, composto de quatro umidades (100, 75, 50 e 25% da CRA), dois níveis de palha (0 e 16 Mg MS ha<sup>-1</sup>), com ou sem adição de nitrogênio (0 e 21 kg ha<sup>-1</sup>, equivalente a 8,3 mg N kg<sup>-1</sup> solo), durante 63 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos com N foram aplicados sem diluição, superficialmente ao solo e à palha, sendo que a fonte utilizada foi o sulfato de amônio que apresenta 21% de N (Vargas et al., 2014b).

#### 4.1.3 Amostragem de solo

As amostragens de solo foram realizadas aos 142 e 205 dias de incubação do solo (DIS). Em seguida as amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório. Para as análises da estrutura das comunidades bacterianas, foram coletadas aproximadamente 20 gramas de terra de cada amostra e foram armazenados em ultra freezer a -80°C para posterior extração de DNA total do solo.

#### 4.1.4 Parâmetros microbiológicos do solo analisados

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi analisado conforme o método de fumigação-extração, proposto por Vance et al. (1987), onde a amostra de solo foi dividida em duas sub-amostras, uma das quais foi fumigada com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) livre de etanol, e a outra foi mantida ao natural. O carbono liberado pela morte dos microrganismos foi então determinado por extração seguido de digestão, e comparado às amostras de solo não-fumigadas. As amostras fumigadas foram incubadas por um período de 5 dias a uma temperatura de 28°C. O carbono microbiano foi extraído com o emprego de extrator K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Depois, as soluções de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> recebem K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, que oxida o carbono extraído. A partir da diferença entre o volume excedente do K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> das amostras fumigadas e não fumigadas, foi calculada a quantidade de Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> gasto na oxidação do C-orgânico e, conseqüentemente, a quantidade de carbono da biomassa microbiana extraída.

O cálculo da biomassa representada pelo carbono microbiano do solo foi então determinado a partir da fórmula:

$$CBM(\mu g C g^{-1} solo) = \left( \frac{C_f - C_{nf}}{k_c} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde: C<sub>f</sub>: carbono extraído da sub-amostra fumigada; C<sub>nf</sub>: carbono extraído da sub-amostra não fumigada; k<sub>c</sub>: 0,38 (fator de correção).

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi obtido segundo Brookes et al. (1985), utilizando também o método da fumigação-extração apresentado para o CBM (Jenkinson e Powlson, 1976). O cálculo da quantidade de nitrogênio microbiano foi feito conforme a equação abaixo:

$$NBM(\mu g N g^{-1} solo) = \left( \frac{N_f - N_{nf}}{k_n} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde: N<sub>f</sub>: nitrogênio extraído da sub-amostra fumigada; N<sub>nf</sub>: nitrogênio extraído da sub-amostra não fumigada; k<sub>n</sub>: 0,54 (fator de correção).



A relação C/N microbiana (C/Nmic) foi estimada pela relação entre os valores do carbono da biomassa microbiana e do nitrogênio da biomassa microbiana, de acordo com a seguinte equação:

$$C/N = \left( \frac{CBM}{NBM} \right) \text{ Equação 3}$$

A respiração basal do solo (RBS) foi quantificada a partir da liberação de CO<sub>2</sub>, de acordo com o método de Alef (1995) modificado, pelos quais amostras de 100 g solo foram colocadas em frascos herméticos com a umidade do solo original de cada tratamento; em cada frasco hermético foi mantido um frasco de Erlenmeyer com 10 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida os frascos herméticos foram incubados a 28°C por 3 dias. Para avaliação da quantidade de CO<sub>2</sub> liberado, o frasco de Erlenmeyer recebeu 1 mL de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) a 50% e 3 gotas de fenolftaleína para a titulação do NaOH livre com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A titulação do NaOH livre permitiu quantificar, por subtração, a quantidade de CO<sub>2</sub> que reagiu com o NaOH. Também foram mantidos controles, sem solo, contendo frascos com NaOH. Os resultados foram expressos em µg de CO<sub>2</sub> por g<sup>-1</sup> de solo seco dia<sup>-1</sup>.

O quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) foi estimado pela relação entre os valores da liberação do CO<sub>2</sub> e o CBM, de acordo com Anderson e Domsch (1990) e segundo a seguinte equação:

$$qCO_2 (\mu g CO_2 \mu g CBM^{-1} dia^{-1}) = \left( \frac{\mu g C - CO_2}{\mu g C - BM} \right) \text{ Equação 4}$$

#### **4.1.5 Análise da comunidade bacteriana**

##### ***Extração de DNA do solo***

O DNA foi extraído utilizando-se o *Power Soil DNA Isolation Kit* (MoBio, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, para observação da integridade e qualidade do DNA, uma alíquota de 5µl foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (w/v) em tampão TAE 1x (Tris, Ácido acético, EDTA) por 30 min a 80 V, seguido de coloração em brometo de etídio por 20 min e observação em luz ultravioleta. O resultado foi visualizado e comparado juntamente com 6µl de Gene Ruler™, DNA Ladder Mix (Fermentas Life Science, EUA), utilizado como marcador de peso molecular.

##### ***Análise em gel de eletroforese em gradiente desnaturante (PCR-DGGE)***

O DNA dos microrganismos presentes nas amostras de solo foi utilizado para a amplificação do gene 16S DNAr de Bacteria por meio da reação de PCR, utilizando o

conjunto de *primers* 1492 R/799F em ambos os períodos de DIS e os *primers* U968GC/1492 e U968GC/1387 aos 142 e 205 DIS respectivamente. A reação com os iniciadores 1492 R/799F foi igual para os dois períodos, no qual foi realizada em volume de 25µl, contendo 1,875µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2µl de 2,5 mM de dNTP, 2,5µl de tampão Taq, 0,1µl de 100mM de cada *primer*, 0,05µl de 1mg.ml<sup>-1</sup> de BSA, 0,5µl de Taq DNA polymerase e 1µl de DNA molde (5 a 10 ng), sendo completado o volume com água para injeção. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 20 minutos, 53°C por 40 minutos e 72°C por 40 minutos; e, finalmente, uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto amplificado na primeira reação foi utilizado para a segunda reação com os iniciadores U968GC/1492 e U968GC/1387, onde foi utilizado um volume de 50µl, contendo 5µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4µl de 2,5 mM de dNTP, 5µl de tampão Taq, 0,2µl de 100mM de cada *primer*, 0,5µl de Formamida, 0,5µl de Taq DNA polymerase e 1 µl de PCR, sendo completado o volume com água para injeção., onde As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e, finalmente, uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Posteriormente quantidades iguais dos amplicons de Bacteria foram analisadas através de eletroforese em gel com 6% de poliacrilamida, contendo um gradiente de 45% e 65% e outro de 45% e 60% de formamida e ureia, onde 100% de desnaturação consiste em 7M de ureia e 80% de formamida para os 142 e 205 DIS respectivamente. Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 h a 100 Volts com temperatura de 60°C utilizando-se o equipamento Ingeny Phor-U System (Ingeny International, Goes, The Netherlands). Após a eletroforese os géis foram corados com Sybr Gold (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e a obtenção das imagens foi feita a partir do densitômetro a laser Storm<sup>Tm</sup> 845(GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

#### **4.1.6 Análise Estatística**

Os dados das variáveis biológicas do solo foram submetidos à análise de regressão e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados pelo software SISVAR (Ferreira, 2011). Foram determinadas correlações de Pearson entre as características estudadas a partir do software Assistat (Silva e Azevedo, 2016).

No PCR-DGGE, os perfis dos 'amplicons' obtidos foram analisados e comparados utilizando o programa Image Quant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA), visando-se obter uma matriz de presença e ausência de bandas.

A partir das matrizes geradas, foi realizada a análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), no programa WinKyst CANOCO® versão 4.5 (Ter Braak & Smilauer, 2002), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtys. Associado a NMDS, os agrupamentos formados pelas comunidades microbianas foram validados e separados baseando-se nos valores de R adquiridos da análise de similaridade (ANOSIM) no programa PAST versão 3.11 (Hammer, Ø et al., 2001).

Para demonstrar a heterogeneidade espacial dos tratamentos estudados, foram realizadas análises de gradiente indireto no programa CANOCO® versão 4.5 (Ter Braak e Smilauer, 2002), onde a distribuição dos dados foi testada a partir de análises de DCA (Detrended Correspondence Analysis). A partir da DCA foi possível a realização da PCA (Principal Component Analysis), onde foi utilizada uma ordenação linear que visou correlacionar os atributos microbianos as variáveis ambientais relacionando-os individualmente e determinando quais desses fatores foram mais expressivos para elucidar a variação nos tratamentos estudados.

## **4.2 Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar sob efeito da temperatura**

### **4.2.1 Condução do experimento**

Amostras de solo foram incubadas em colunas confeccionadas com tubos de PVC contendo dois níveis de palha (0 e 8 Mg MS ha<sup>-1</sup>) em ambiente com temperaturas entre 21 e 27° durante 76 dias. Posteriormente a este período, as colunas tiveram a umidade corrigida a 50% da capacidade de campo, sendo mantidas por mais 92 dias de incubação. Em cada coluna foi inserida uma película plástica perfurada, para evitar a evaporação demasiada de água. Diariamente as colunas foram pesadas e quando necessário a água foi repostada (Vargas, 2014a).

A descrição sobre a coleta e características físico-químicas do solo e da palha utilizados neste experimento estão descritos no subitem 4.1.1 e conforme Vargas et al. (2014b). O experimento constou de um fatorial, composto de duas temperaturas (20 e 30°), dois níveis de palha (0 e 8 Mg MS ha<sup>-1</sup>), com ou sem adição de nitrogênio (0 e 100 kg ha<sup>-1</sup>). O delineamento foi completamente casualizado, com três repetições. Os tratamentos com N foram aplicados superficialmente, sendo que a fonte utilizada foi o nitrato de amônio (Vargas, 2014a).

As temperaturas utilizadas foram selecionadas mediante a faixa de temperatura do solo, verificada em campo na região produtora de cana-de-açúcar, onde o solo foi retirado. Foram utilizadas incubadoras do tipo BOD (Modelo TE 391, Tecnal), onde foram inseridas as colunas com e sem palha e com ou sem nitrogênio em cada uma das temperaturas. O controle das temperaturas foi realizado por meio dos sensores das incubadoras, além de um termômetro de mercúrio situado dentro de cada incubadora. A temperatura do solo foi aferida, a partir da inserção de termômetros com haste de metal. Durante a condução do experimento as incubadoras permaneceram fechadas (Vargas, 2014a). Essas temperaturas utilizadas caracterizam o desenvolvimento e atividade de microrganismos mesófilos presentes entre 20 – 40°C (Moreira e Siqueira, 2006).

### **4.2.2 Amostragem de solo**

As amostragens de solo foram realizadas aos 76 e 168 dias de incubação do solo (DIS). A seguir as amostras recém coletadas foram embaladas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório.

#### **4.2.3 Propriedades microbiológicas do solo analisadas**

No carbono da biomassa microbiana (CBM) seguiu-se o procedimento de fumigação-extração de Vance et al. (1987), no qual a amostra de solo foi repartida em duas sub-amostras, onde uma delas foi fumigada com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) livre de etanol, suprimindo-se os microrganismos vivos, e a segunda permaneceu ao natural. Para a extração do carbono microbiano utilizou-se o  $\text{K}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , seguida de oxidação com  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , digestão ácida e titulação. A seguir os resultados foram expressos em  $\mu \text{ C g}^{-1}$  solo.

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi determinado segundo Brookes et al. (1985), onde foi utilizado também o método da fumigação-extração conforme o carbono da biomassa microbiana (Jenkinson e Powlson, 1976), sendo os resultados demonstrados em  $\mu \text{g N g}^{-1}$  solo.

A respiração do solo (RBS) foi verificada a partir da emissão de  $\text{C-CO}_2$  capturado por  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ . Em seguida foi efetuada a titulação com  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , possibilitando a quantificação, por subtração, do quantitativo de  $\text{CO}_2$  que reagiu com o  $\text{NaOH}$  (Alef, 1995). Os resultados foram apresentados em  $\mu \text{g de CO}_2$  por  $\text{g}^{-1}$  de solo seco  $\text{dia}^{-1}$ .

A razão C/N microbiano (C/Nmic) foi estimada segundo os valores do carbono da biomassa microbiana e do nitrogênio da biomassa microbiana.

O quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi obtido por meio da razão dos valores adquiridos entre a respiração do solo e o carbono da biomassa microbiana, conforme Anderson e Domsch (1990).

#### **4.2.4 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância com o teste F, utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2011), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . Também foram estimadas correlações de Pearson entre os atributos avaliados pelo software Assistat (Silva e Azevedo, 2016).

Os dados também foram analisados a partir de análises multivariadas no programa Canoco® versão 4.5 (Ter Braak; Smilauer, 2000), onde inicialmente foi testada a Detrended Correspondence Analysis (DCA) para verificar a distribuição dos dados. Em seguida a partir da DCA, foi realizada a Principal Component Analysis (PCA) com a finalidade de explicar a variação multidimensional em representação gráfica, dispondo os componentes mediante a similaridade entre os parâmetros estudados.

## Parte II: Amostragem de solo em experimento de campo

### 4.3 Propriedades microbiológicas em latossolos cultivados com de cana-de-açúcar

#### 4.3.1 Condução do experimento

O estudo foi realizado nos municípios de Piracicaba (Área 1) e Jaú (Área 2), SP situadas respectivamente a 22°41'6" S e 47°38'55"O e de 22°17'44"S e 48°33'28" O, a uma altitude de 547 e 541 m e uma área territorial de 1.377 e de 688,337 km<sup>2</sup>. Os solos das áreas foram um Latossolo Vermelho-Amarelo e um Latossolo Vermelho-escuro álico, que apresentaram na camada de 0 – 20 cm texturas argilosa e franco-arenosa, simultaneamente com 560, 122 e 318 kg<sup>-1</sup> e 178, 56 e 766 kg<sup>-1</sup> de argila, silte e areia, respectivamente, conforme Camargo et al. (2009), baseado no método da pipeta. As características químicas dos solos das áreas na camada de 0 – 20 cm, estão descritas na Tabela 3, segundo recomendações de Raij et al. (2001). Os climas são classificados como Cwa ou tropical de altitude e Aw ou tropical com inverno seco de acordo com a classificação de Köppen (1936), com temperaturas médias anuais de 24° C e 23° C, umidade relativa do ar anual de 73,5% e 70% e com 1.321 e 1.344 mm anuais de precipitação total, respectivamente.

A cultura da cana-de-açúcar está estabelecida nas áreas a mais de 10 anos, sendo que os plantios ocorreram em abril de 2010 e seguiram os procedimentos de aração profunda, gradagem, e sulcamento do solo. Os tratamentos avaliados consistiram de uma dose de N (150 kg ha<sup>-1</sup>) e um tratamento isento de N, sob cultivo de cana-de-açúcar na fase de soqueira. A fonte de N foi o nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro repetições.

**Tabela 3** - Resultado da análise de fertilidade dos solos das áreas 1 e 2.

pH	C	N	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
	—g/Kg—		g/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>		—mmolc/dm <sup>3</sup> —				%
Área 1										
5,0	14,0	0,6	28	11,3	3,8	44	21	30	99	69
Área 2										
4,8	7,0	0,3	22	17,8	1,6	16	6	25	49	48

C e N: analisador elementar; pH: solução em CaCl<sub>2</sub> (0,01 mol L<sup>-1</sup>); P, K, Ca e Mg: método da resina trocadora de íons; H+Al: solução tampão SMP. Fonte: Vargas et al. (2014b)

#### **4.3.2 Amostragem de solo**

Nas amostragens do solo foram retiradas quatro amostras compostas formadas por dez amostras simples, na profundidade de 0 –10 e 10-20 cm, sendo coletadas na entrelinha de cada tratamento para as análises das propriedades microbiológicas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo do Centro de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico (IAC) em Campinas-SP, onde foram passadas em peneira 2,0 mm de malha e homogeneizadas (preparo de terra fina seca ao ar - TFSA), sendo mantidas a temperatura de 4° C até o momento das análises laboratoriais.

#### **4.3.3 Atributos microbiológicos do solo analisados**

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método de fumigação-extração (Vance et al., 1987), onde a amostra de solo foi dividida em duas sub-amostras, uma das quais foi fumigada com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) isento de etanol, eliminando-se os microrganismos vivos, e a outra, mantida ao natural. O carbono microbiano foi extraído com  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e oxidado com  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi obtido conforme Brookes et al. (1985), utilizando-se também o método da fumigação-extração segundo o CBM (Jenkinson e Powlson, 1976).

Já a relação C/N microbiana (C/Nmic) foi obtida por meio da divisão do CBM pelo NBM.

A respiração basal do solo (RBS) foi quantificada pela liberação de  $\text{CO}_2$  conforme o método de Alef (1995), onde foi realizada a titulação do NaOH livre com HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , permitindo a quantificação, por subtração, da quantidade de  $\text{CO}_2$  que reagiu com o NaOH.

O quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi estimado a partir da relação dos valores obtidos da RBS e do CBM (Anderson; Domsch, 1990).

Para a estimativa da densidade populacional das comunidades microbianas de amonificadores e nitrificadores foi utilizado o método do número mais provável (NMP), no qual foram transferidos 10 g de solo úmido para erlenmeyers de 125 mL contendo 90 mL da solução salina estéril e pérolas de vidro, seguida de agitação por 30 minutos, a 170 rpm. Em câmara de fluxo laminar com filtros, para manter ambiente asséptico, foi transferido 1 mL da diluição  $10^{-1}$  e realizadas diluições sucessivas do solo até a ordem de  $10^{-6}$  em tubos com 9 mL de solução salina, esterilizada em autoclave a 121°C (Andrade et al., 1994).

Em seguida as suspensões foram inseridas em meios de cultura específicos para cada microrganismo. Posteriormente foram utilizadas três diluições decimais e

repetições de três tubos para estimar o NMP de células viáveis dos amonificadores (AMO), oxidantes do amônio (NITRI) e oxidantes do nitrito (NITRA), realizada com a utilização das tabelas de ocorrência e os limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95% de probabilidade, sendo os dados expressos em base de solo seco (Andrade et al., 1994).

### ***Organismos amonificadores***

Foi utilizado um meio de cultura constituído por sais, uma fonte de nitrogênio orgânico e corante para detectar a presença de amônia, proveniente da atividade dos microrganismos. Foram adicionados em tubos de ensaio, 4 mL do meio de cultura líquido Sarathchandra (1978), autoclavado, e em seguida foram transferidos 1 mL de cinco suspensões diluídas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) com três repetições e incubados no escuro, a 28°C, durante três dias. No terceiro dia de incubação, a determinação do número de células viáveis foi feita pela observação visual da produção de amônia, ou seja, mudança da coloração laranja para rosa, devido à elevação do pH acima de 7,0. Os tubos com mudança na coloração foram anotados como positivos (presença) e os sem alteração como negativos (ausência) para AMO (Andrade et al., 1994).

### ***Organismos nitrificadores***

Nessa avaliação foi transferido 1 mL das suspensões diluídas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  para NITRI e de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  para NITRA para tubos de ensaio contendo 4 mL do meio de cultura inorgânico líquido (Schmidt e Belser, 1982), em três repetições. Durante seis semanas os tubos de ensaio foram incubados a 28°C no escuro. Para a detecção da presença ou ausência desses organismos foram utilizados os reagentes de Griess-Ilosvay, onde foram transferidos 0,1 mL do meio inoculado para uma placa de Petri e em seguida foi adicionada uma gota do reagente “diazoting reagent” (solução de sulfanilamida) e uma gota do reagente “coupling reagent” (N-naphtyl ethylenediamine hydrochloride). Os tubos foram observados e o resultado foi considerado positivo para NITRI, quando ocorreu coloração vermelha, e quando apresentou coloração rósea foi anotado como positivo, para NITRA (Andrade et al., 1994).

Foram realizadas as seguintes análises enzimáticas na Área 2:

### ***Desidrogenase***

Para a atividade da desidrogenase foi utilizado o método conforme Casida et al. (1964), no qual foi incubado 5,0 g de terra fina seca ao ar (TFSA) em tubo de ensaio de 20 mL, sendo adicionado 5 mL de TCC 1% (tetrazolium cloreto de sódio). Em seguida os tubos foram agitados e incubados no escuro a 37 °C durante 24 horas.



Após a incubação, procedeu-se à extração do trifenilformazan (TFF), adicionando-se 10 mL de metanol, sendo os tubos agitados novamente. Em seguida, os tubos permaneceram em repouso até a decantação do solo, sendo retirados os sobrenadantes e posteriormente foram centrifugados por 10 minutos a 3400 rpm. Após a centrifugação, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm. Foi preparada uma curva padrão com concentrações crescentes de solução de TFF (trifenilformazan), sendo então calculada a quantidade de TFF produzido com a reação enzimática. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de TFF  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

### ***Protease***

Na atividade da protease, foi adicionado 1,0 g de solo úmido, sendo incubado com 5 mL de caseinato de sódio 2 % (p/v) em tampão tris-HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 8,1, por 2 h em pH 8,1 a 50 °C. Em seguida foi determinada a quantidade de tirosina liberada por meio da reação com o reagente Folin-Ciocateau (formação de um complexo de cor azul), cuja absorbância foi lida por espectrometria em comprimento de onda de 700 nm (Alef e Nannipieri, 1995). A atividade foi expressa em  $\text{mg g}^{-1}$  de tirosina no solo seco.

### ***Fosfatase alcalina***

Para a atividade da fosfatase alcalina, foi adicionado 1g de solo em erlenmeyer de 50 ml, com 0,2 ml de tolueno, 4 ml de MUB (pH 6,5 ou pH 11) e 1ml de solução *p*-nitrofenol fosfato dissodium. Em seguida, os frascos foram tampados, agitados e incubados por 1 hora à 37°C. Posteriormente, foram adicionados aos frascos, 1ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M e 4ml de NaOH 0,5 M e agitados novamente. Após essa etapa, a suspensão de solo presente nos frascos foi filtrada em papel de filtro, sendo determinada a formação de *p*-nitrofenol e cuja absorbância foi lida por espectrofotometria em comprimento de onda 410 nm. A atividade foi expressa em  $\mu\text{g p-NPP g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Eivazi e Tabatabai,1977).

#### **4.3.4 Análise Estatística**

Os dados das variáveis microbiológicas do solo foram submetidos à análise de variância com o teste F, sendo as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo analisados pelo software SISVAR (Ferreira, 2011). Também foram feitas correlações de Pearson entre os parâmetros avaliados utilizando-se o software Assisat (Silva e Azevedo, 2016).

Realizou-se uma análise multivariada visando demonstrar a disparidade espacial dos tratamentos estudados, no qual foram realizadas análises de gradiente indireto no programa CANOCO® versão 4.5 (Ter Braak; Smilauer, 2000), sendo primeiramente avaliada a Detrended Correspondence Analysis (DCA) para investigar a distribuição dos dados. Após a DCA, foi feita a Principal Component Analysis (PCA) para determinar relações entre os atributos microbianos (CBM, NBM, C/Nmic, RBS, qCO<sub>2</sub>, AMO, NITRI, NITRA) e os respectivos tratamentos (com e sem adubação nitrogenada) nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm.

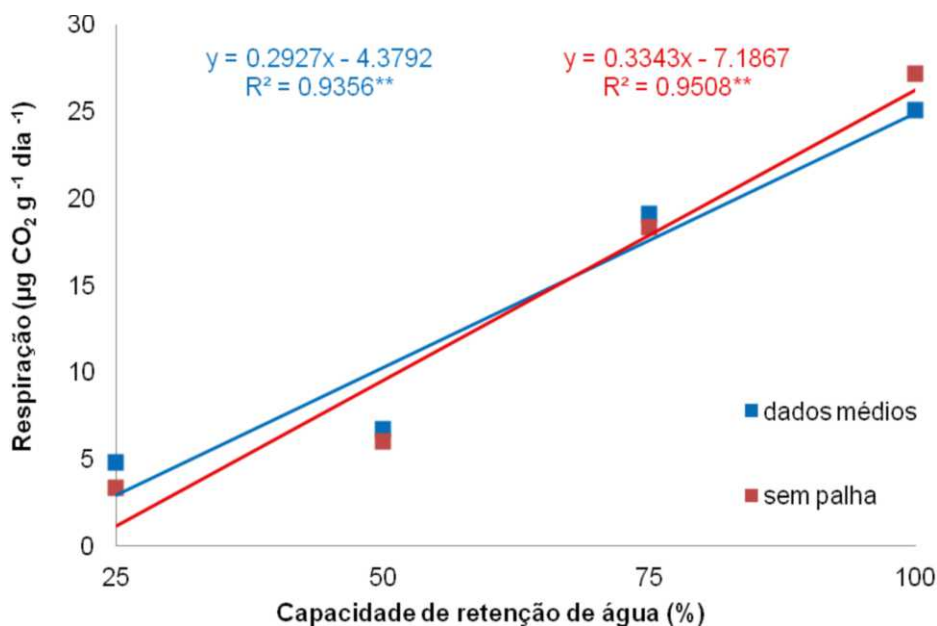
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parte I: Amostragem de solo em experimentos sob condições controladas

#### 5.1 Atributos microbianos e perfil de comunidades bacterianas em solo cultivado com cana-de-açúcar

##### 5.1.1 Parâmetros microbiológicos do solo analisados

Aos 142 dias de incubação, na respiração basal do solo, as concentrações variaram de 3,37 a 27,13  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  nos tratamentos sem palha e com 25 e 100% de umidade respectivamente e de 6,24 a 23,00  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  nos tratamentos com palha e com 25 e 100% de umidade. Verifica-se que a liberação de  $\text{CO}_2$  aumentou com o incremento das umidades, atingindo o maior valor, cerca de 27  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  na umidade 100% (Figura 1).

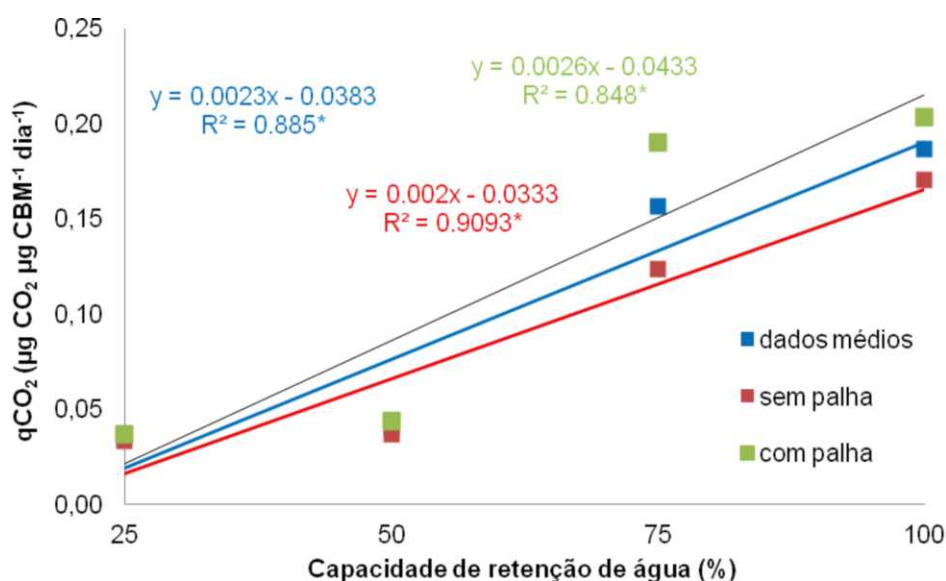


**Figura 1** – Respiração basal do solo aos 142 dias após incubação do solo, em função da palha e da umidade, Campinas-SP. Com palha: Não significativo (não inserido)

De acordo Kang et.al. (2003), a umidade do solo é um fator preponderante no controle da respiração do solo, já que auxilia nas atividades dos organismos. Para Yu et al. (2011), a baixa umidade do solo limita a respiração pela diminuição do contato microbiano com o substrato, além disso, pode levar à morte ou latência dos microrganismos. Porém a alta umidade do solo limita as trocas gasosas entre o solo e a atmosfera, conduzindo, assim, a uma baixa concentração de oxigênio no solo o que

restringe a respiração aeróbia das comunidades microbianas do solo. Entretanto, vale ressaltar que, diferenças entre as taxas de respiração do solo são observadas nos ecossistemas e conforme as condições ambientais. E diante disto, estudos realizados por Zha et al. (2007), Irvine (2008) e Ruehr et al. (2010), têm sido feitos com o intuito de quantificar as diferenças encontradas para melhor avaliação e compreensão das respostas da respiração do solo às variáveis ambientais.

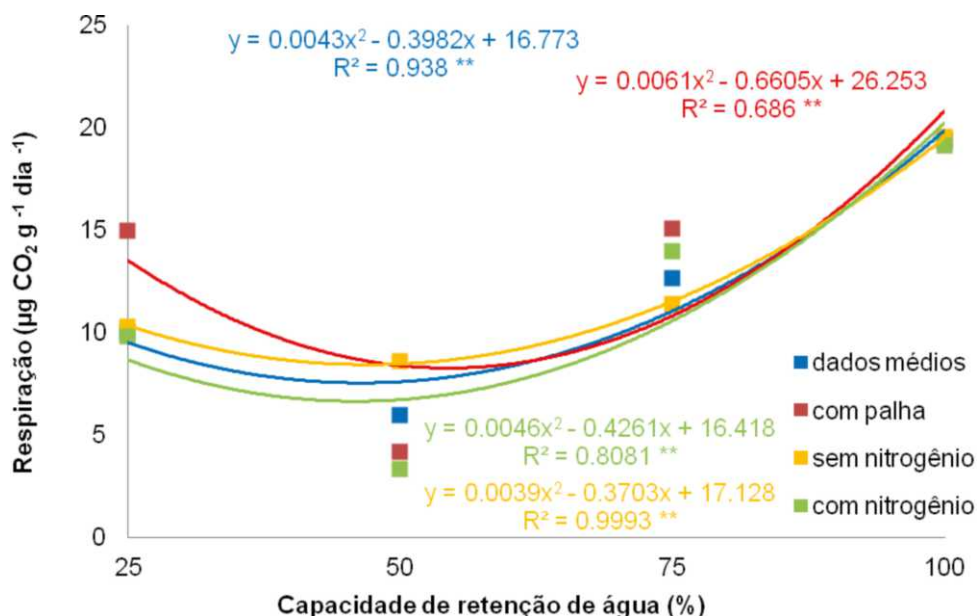
No quociente metabólico ( $qCO_2$ ) foram verificados valores de 0,03 a 0,20  $\mu g$  entre os tratamentos sem e com palha. Verificou-se que o quociente metabólico aumentou com o incremento das umidades, especialmente na umidade 100% com e sem palha 16 Mg  $ha^{-1}$  (Figura 2). O  $qCO_2$  é a taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana e indica o quanto a população microbiana está sendo eficiente em incorporar o carbono da matéria orgânica em sua biomassa (Anderson and Domsch, 1985) e neste caso é possível que os tratamentos com 25 e 50% de umidade, esteja em menor condição de distúrbio ou estresse ambiental (Wardle, 1993), em relação aos tratamentos com 75 e 100% de umidade.



**Figura 2** – Quociente metabólico aos 142 dias após incubação do solo, em função da palha e da umidade, Campinas-SP.

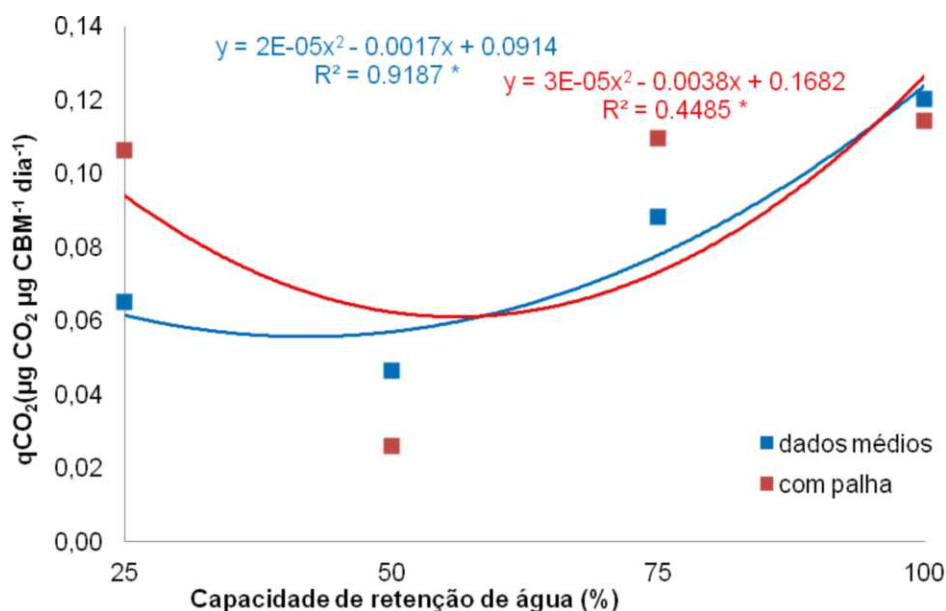
Já aos 205 dias houve aumento da respiração basal com o incremento das umidades, independente da adição ou não de nitrogênio, atingindo o maior valor, cerca de 20  $\mu g$  CO<sub>2</sub>  $g^{-1}dia^{-1}$  na umidade 100% (Figura 3). De acordo com La Escala et al. (2000), a umidade apresenta maior variação, dentre os demais fatores que influenciam

na liberação de CO<sub>2</sub>, sendo preponderante no ritmo da atividade biológica. Entretanto, conforme reportado Maluche-Baretta et al. (2007), é provável que as populações microbianas presentes nos tratamentos com as menores umidades apresentaram uma redução no metabolismo energético para sua manutenção, já os organismos existentes nos tratamentos com as maiores umidades estejam em situação de estresse.



**Figura 3** – Respiração basal do solo aos 205 dias após incubação do solo, em função da palha, da umidade e do nitrogênio, Campinas-SP. Sem palha: Não significativo (não inserido).

O quociente metabólico aumentou com o incremento das umidades, atingindo o maior valor, cerca de 0,12 µg na umidade 100% (Figura 4). Maiores valores de qCO<sub>2</sub> resultam em menor utilização do C orgânico mineralizável, promovendo diminuição na incorporação de C orgânico às células microbianas, e incremento das perdas de C sob a forma de CO<sub>2</sub> para a atmosfera (Anderson, 2003; Cunha et al., 2011). Resultados como este também foram observados por Tavares et al. (2015) onde observou valores de 0,1 a 0,63 µg CO<sub>2</sub> µg/ µg C-BMS dia<sup>-1</sup>, em sistemas de cultivo de cana crua com 10 anos e de cana queimada, respectivamente.



**Figura 4** – Quociente metabólico aos 205 dias após incubação do solo, em função da palha e da umidade, Campinas-SP. Sem palha, sem nitrogênio e com nitrogênio: não significativos (não inserido).

Aos 142 dias observou-se as seguintes de correlações entre as variáveis avaliadas: correlação significativa positiva entre a respiração basal x quociente metabólico ( $r = 0,81$ ) e correlações significativas negativas entre carbono da biomassa microbiana x quociente metabólico ( $r = - 0,42$ ) (Tabela 4). E aos 205 dias observou-se que houve correlação significativa positiva entre a respiração basal x quociente metabólico ( $r = 0,71$ ) e correlações significativas negativas entre carbono da biomassa microbiana x quociente metabólico ( $r = - 0,75$ ), nitrogênio da biomassa microbiana x relação c/n microbiana ( $r = - 0,52$ ) (Tabela 5).

A correlação positiva entre a respiração basal e o quociente metabólico pode ser justificada do seguinte modo, onde a liberação de energia proveniente da atividade celular foi incrementada pelas umidades aplicadas e assim elevou a taxa respiratória específica. Já a correlação negativa entre o carbono da biomassa microbiana e o quociente metabólico é explicada pelo excesso de carbono utilizado pela biomassa no metabolismo celular, o que desencadeou em possível desequilíbrio. Esse estresse foi proveniente da condição ambiental adversa oriunda das elevadas umidades que pode ter provocado um desarranjo funcional na microbiota do solo. Delbem et al. (2011) estudando a atividade microbiana e a fertilidade do solo cultivado com *Brachiaria brizantha* também verificaram correlações negativas entre os teores de CBM e  $qCO_2$

A correlação negativa entre o nitrogênio da biomassa microbiana e a relação c/n microbiana pode indicar que houve imobilização de nitrogênio pela biomassa, diminuindo sua disponibilidade. Este fato decorre das alterações provocadas pelas diferentes umidades aplicadas no experimento. Ainda, é possível que a alta relação C/N da palha de cana-de-açúcar possa ter contribuído também na baixa mineralização do referido elemento. Em trabalho realizado por Monteiro e Gama-Rodrigues (2004), avaliando a ação da qualidade nutricional e orgânica sobre a atividade do carbono e do nitrogênio da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira em floresta natural no entorno do Parque Estadual do Desengano-RJ, também foram obtidas correlações negativas entre o NBM e a razão C/Nmic.

**Tabela 4** - Matriz de correlação linear simples entre os atributos microbiológicos e os gases de efeito estufa aos 142 dias de incubação do solo. Campinas-SP.

	RBS	CBM	qCO <sub>2</sub>
RBS	1,00		
CBM	0,01	1,00	
qCO <sub>2</sub>	0,81**	-0,42*	1,00

Valores seguidos por (\*) ou (\*\*) indicam diferença significativa a 5 e a 1% de probabilidade respectivamente pelo teste de Pearson. RBS: Respiração basal do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico.

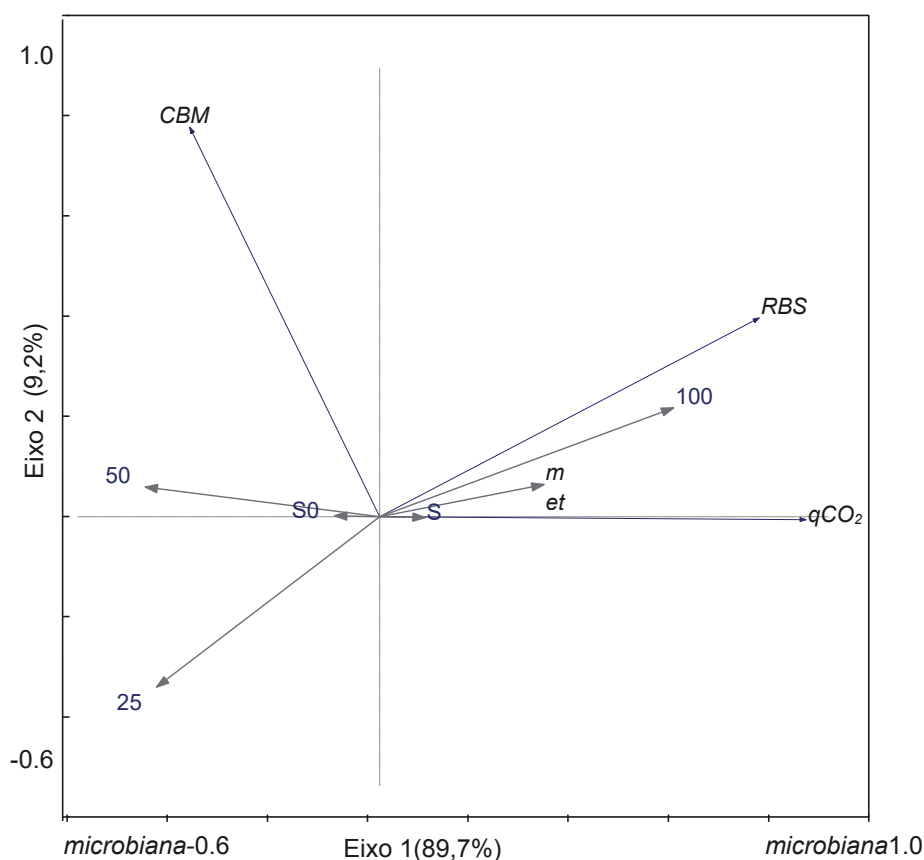
**Tabela 5** - Matriz de correlação linear simples entre os atributos microbiológicos e os gases de efeito estufa aos 205 dias de incubação do solo. Campinas-SP.

	RBS	CBM	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic
RBS	1,00				
CBM	-0,24	1,00			
qCO <sub>2</sub>	0,71**	-0,75**	1,00		
NBM	0,03	-0,14	0,01	1,00	
C/Nmic	0,06	0,00	-0,02	-0,52**	1,00

Valores seguidos por (\*) ou (\*\*) indicam diferença significativa a 5 e a 1% de probabilidade respectivamente pelo teste de Pearson. RBS: Respiração basal do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano

Os indicadores microbiológicos foram relacionados às variáveis ambientais, ou seja, aos tratamentos aplicados no experimento (S – com palha; S0 – sem palha; N – com nitrogênio; N0 – sem nitrogênio; 25, 50, 75, 100 % - do espaço poroso do solo).

Aos 142 dias, a análise multivariada revelou que o  $qCO_2$  e a RBS, foram bastante correlacionados entre si, se correlacionando bastante com as variáveis ambientais, ou seja, aos tratamentos com palha e umidades de 75 e 100%. Já a variável CBM foi mais correlacionada ao tratamento sem palha e umidades de 25 e 50%. A relação do  $qCO_2$  com as maiores umidades (75 e 100%) pode estar relacionado a condições ambientais desfavoráveis aos grupos biológicos do solo presentes nesses tratamentos, ainda que pela presença da palhada (Figura 5). A correlação do RBS com as umidades de 75 e 100% pode indicar uma possível perda de C orgânico do solo para a atmosfera (Parkin et al., 1996). Isso porque de acordo com Islam e Weil (2000), a maior liberação de  $CO_2$  pode indicar situações de desequilíbrio ou elevada condição de produtividade do sistema solo.

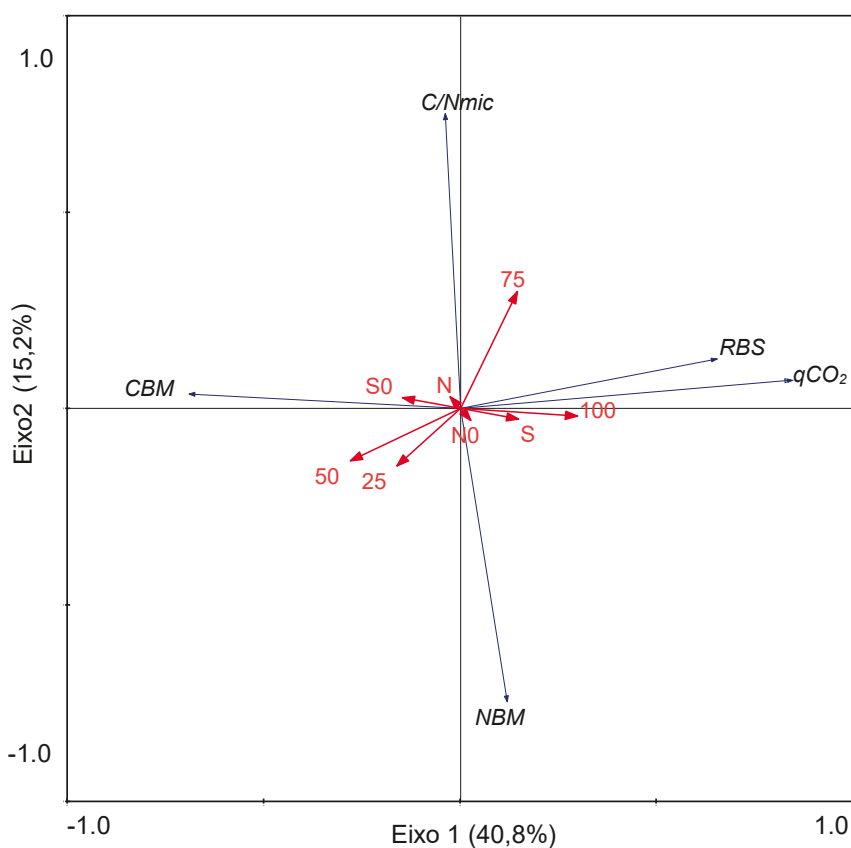


**Figura 5** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos (RBS – respiração do solo;  $qCO_2$  – quociente metabólico; CBM – carbono da biomassa microbiana) em relação às variáveis ambientais (S – com palha; S0 – sem palha; 25,



50, 75, 100 % - do espaço poroso do solo) avaliados em solo cultivado com cana-de-açúcar aos 142 dias de incubação do solo.

Aos 205 dias, em relação à variância explicada, o eixo 1 explicou 40,8% da variabilidade dos dados, onde separou a palha 16 Mg ha<sup>-1</sup>, as umidades 100 e 75% e o nitrogênio 100 kg ha<sup>-1</sup> em um bloco, da palha 0, das umidades 25 e 50% e nitrogênio 0 em um outro bloco. Entretanto, o vetor da variável nitrogênio ficou muito próximo de 0, indicando que essa não foi muito relacionada as demais variáveis. Ainda, a análise da PCA revelou que a RBS e o qCO<sub>2</sub> se correlacionaram bastante com a palha 16 Mg ha<sup>-1</sup> e com a umidade 100% (Figura 6).



**Figura 6** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos (RBS – respiração do solo; qCO<sub>2</sub> – quociente metabólico; CBM – carbono da biomassa microbiana; NBM – nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic – relação carbono e nitrogênio microbiano) em relação às variáveis ambientais (S – com palha, S0 – sem palha; N – com nitrogênio, N0 – sem nitrogênio; 25, 50, 75, 100 % - do espaço poroso do solo) em solo cultivado com cana-de-açúcar aos 205 dias de incubação do solo.

Além disso, RBS e o  $qCO_2$  se correlacionaram com a umidade 75%. O NBM foi correlacionado com a palha  $16 \text{ Mg ha}^{-1}$  e com a umidade 100%. O CBM se correlacionou com a variável sem palha e com a umidade 50%. A variável C/Nmic foi mais relacionada à umidade 75% (Figura 6).

Assim como verificado nos 142 dias o RBS e o  $qCO_2$  estiveram mais relacionados entre si, relacionando-se também aos tratamentos com palha e com 100 e 75% de umidade. Esse comportamento pode ser explicado como um reflexo da comunidade microbiana aos incrementos na umidade do solo. Segundo Araújo e Monteiro (2007), quando a biomassa microbiana está sob perturbação, ocorre um direcionamento maior de energia para conservação celular, ao invés do crescimento, de maneira que parte do carbono da biomassa será perdido como  $CO_2$ .

A relação do NBM com a palha e com 100% de umidade, pode ser explicada pela maior mineralização do substrato vegetal em virtude do aumento da umidade do solo. Quanto a associação do CBM com os tratamentos sem palha e com 50% de umidade, deve-se ao fato de que esse bioindicador desenvolve-se em condições viáveis nos valores de 25 a 75% da capacidade de retenção de água na maioria dos solos, conforme observado por Gonçalves et al. (2002). A correlação entre C/Nmic e a umidade de 75%, provavelmente possa estar associada ao incremento da atuação dos microrganismos nos processos de imobilização (C e N) e mineralização (N) (Gama-Rodrigues et al. 2005), já que de acordo com Wardle (1998) a umidade do solo é um dos elementos preponderantes na regulação da biomassa microbiana.

### **5.1.2 Análise da comunidade bacteriana**

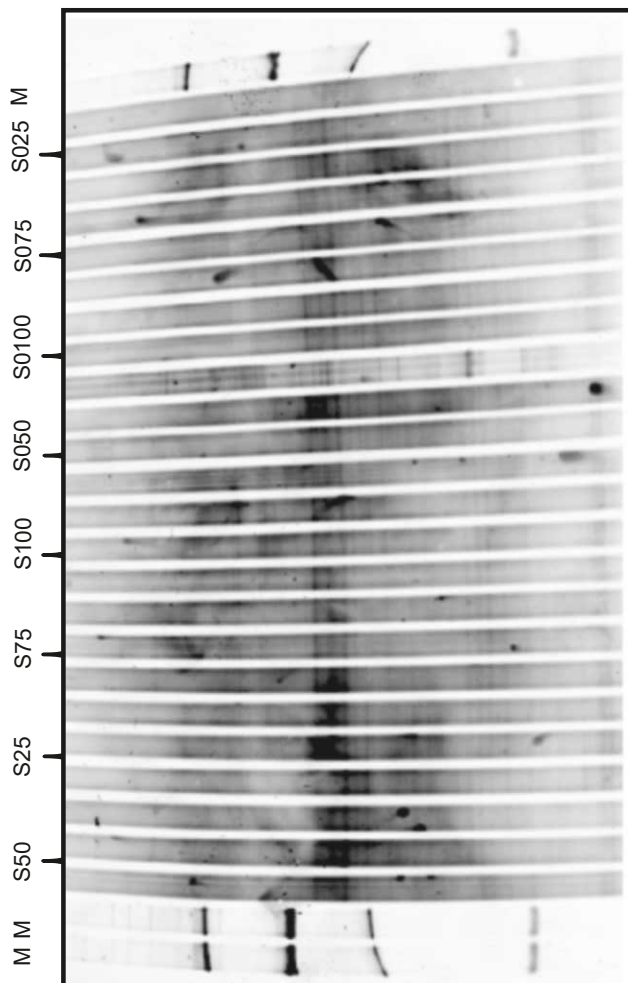
O PCR-DGGE permitiu inferir sobre a estrutura das comunidades microbianas no solo cultivado com cana-de-açúcar. O perfil do DGGE apresentou um grande número de bandas, demonstrando modificações nas comunidades bacterianas ao longo dos tratamentos (Figura 7). De modo geral foi possível a visualização de um grande número de bandas, onde sua separação foi realizada com base na matriz de presença e ausência gerada pelo perfil de PCR-DGGE. Rachid et al. (2012), também verificou modificações na estrutura das comunidades bacterianas que foram fortemente influenciadas pelo uso e manejo do solo nos tratamentos de cana crua e cana queimada em área de Cerrado, na região Centro-Oeste do Brasil.

O perfil das comunidades bacterianas oriundo do PCR-DGGE proporcionou um elevado número de bandas (Figura 8), assim como observado aos 142 dias evidenciando mudanças nos grupos microbianos ao longo dos tratamentos. Rachid et al. (2016), observou que a distinção na estrutura bacteriana esteve mais relacionada a outras características do manejo adotado (colheita manual ou mecânica) tais como a

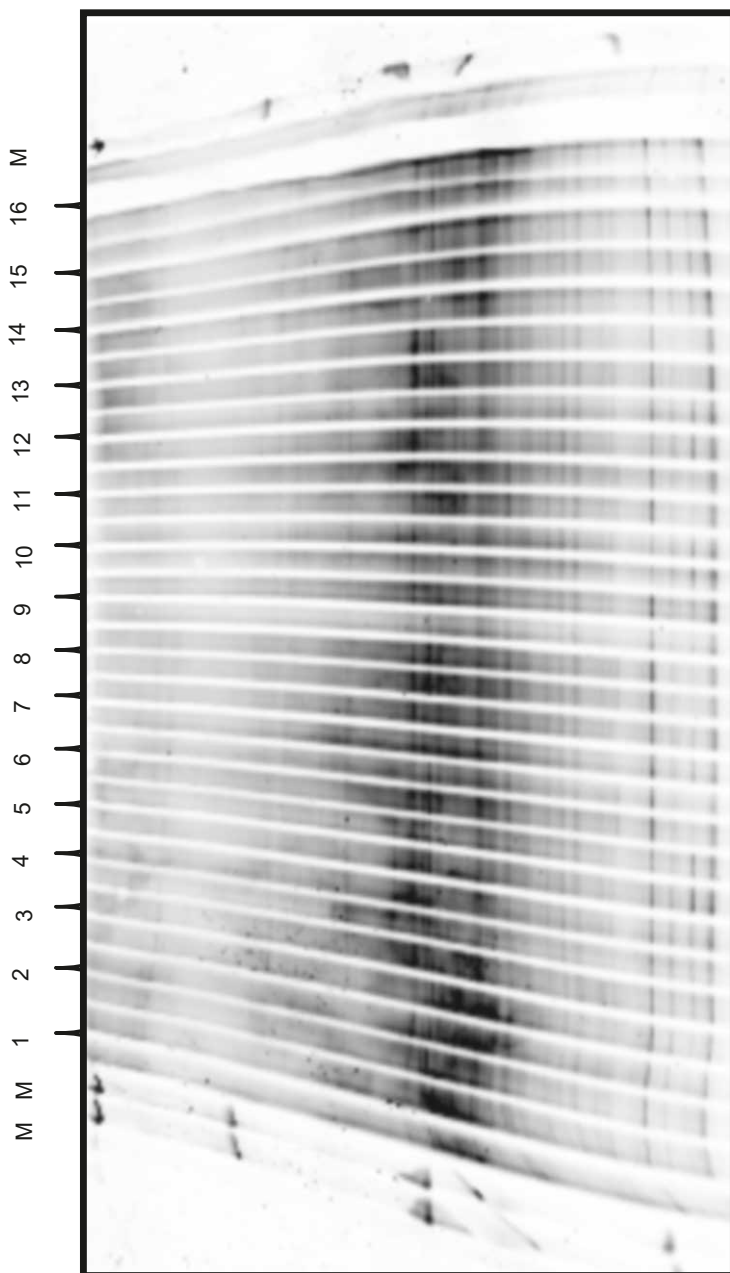
ocorrência de fogo, do que a presença da palhada sobre o solo em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Azevedo et al. (2015) não verificou mudanças na estrutura dos grupos bacterianos presentes em cultivo de cana-de-açúcar nos sistemas com e sem pré-queima.

Aos 142 dias, a análise do dendrograma (Figura 9) gerado a partir do perfil de DGGE 16S mostra que as comunidades bacterianas presentes nas amostras tratamentos com palha de apresentam cerca de 90% de similaridade, o que pode ser explicado pelo fato de serem amostras com houve permanência do resíduo vegetal, que possivelmente conferiu maior equilíbrio à comunidade microbiana dos tratamentos citados. Ainda se observa 100% de similaridade entre as repetições das amostras com 50% da capacidade de retenção de água e com palha 16 Mg ha<sup>-1</sup>).

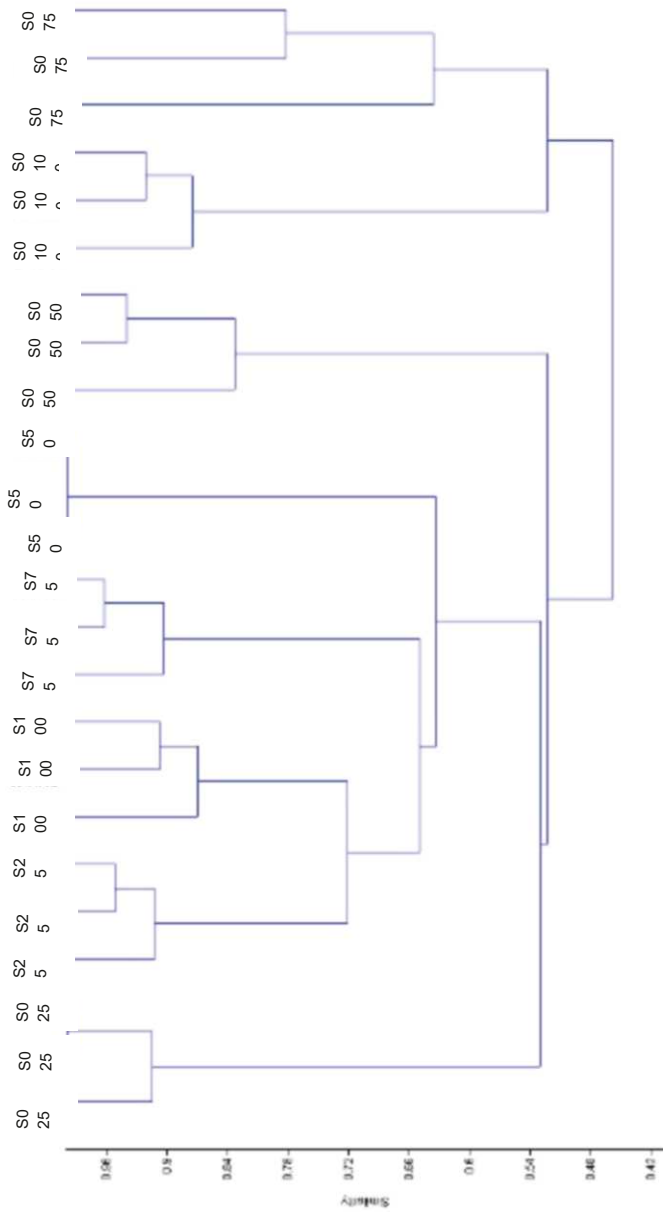
Quanto aos 205 dias a análise do dendrograma (Figura 10) gerado a partir do perfil de DGGE 16S é possível observar que houve similaridade de 100% entre as repetições de todos os tratamentos. As amostras dos tratamentos sem palha e com 75 e 100% da capacidade de retenção de água e com nitrogênio apresentaram cerca de 96% de similaridade, demonstrando que o fator umidade provavelmente não influenciou em possíveis alterações na comunidade bacteriana.



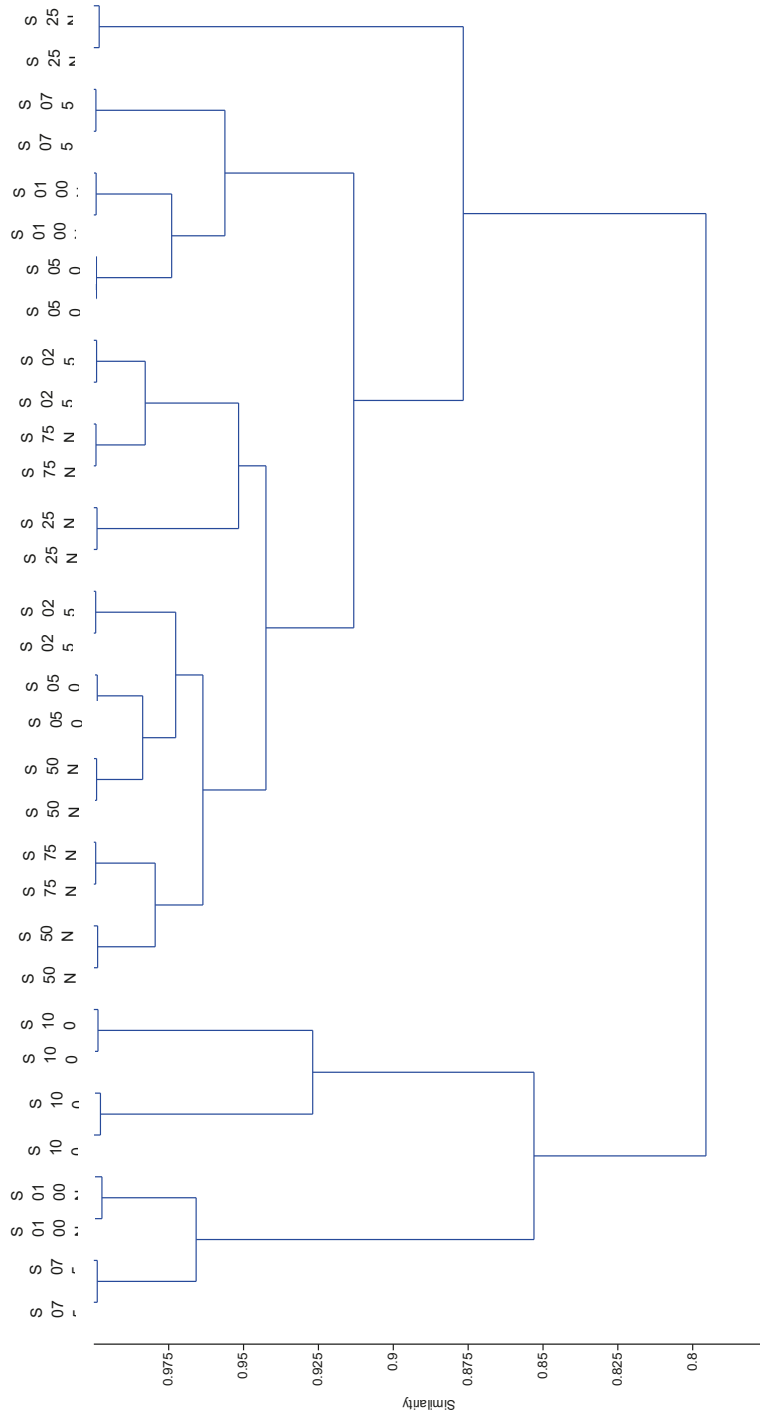
**Figura 7** - Perfil das comunidades bacterianas através da técnica de PCR-DGGE, obtidos dos tratamentos estudados (S25, S50, S75, S100 – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água; S025, S050, S075, S0100 – sem presença de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 142 dias de incubação do solo. M: marcador molecular.



**Figura 8** - Perfil das comunidades bacterianas através da técnica de PCR-DGGE, obtidos dos tratamentos estudados (1= S100N0 – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 100% e sem nitrogênio; 2 = S100N – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 100% e com nitrogênio; 3= S0100N0 – sem palha, com umidade de 100% e sem nitrogênio; 4= S0100N – sem palha, com umidade de 100% e com nitrogênio; 5= S75N0 – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 75% e sem nitrogênio; 6= S75N – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 75% e com nitrogênio; 7= S075N – sem palha, com umidade de 75% e com nitrogênio; 8= S075N0 – sem palha, com umidade de 75% e sem nitrogênio; 9= S50N0 – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 50% e sem nitrogênio; 10= S50N – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 50% e com nitrogênio; 11= S050N0 – sem palha, com umidade de 50% e sem nitrogênio; 12= S050N – sem palha, com umidade de 50% e com nitrogênio; 13= S25N0 – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 25% e sem nitrogênio; 14= S25N – com palha 16 Mg. ha<sup>-1</sup>, com umidade de 25% e com nitrogênio; 15= S025N0 – sem palha, com umidade de 25% e sem nitrogênio; 16= S025N – sem palha, com umidade de 25% e com nitrogênio) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 205 dias de incubação do solo. M: marcador molecular.



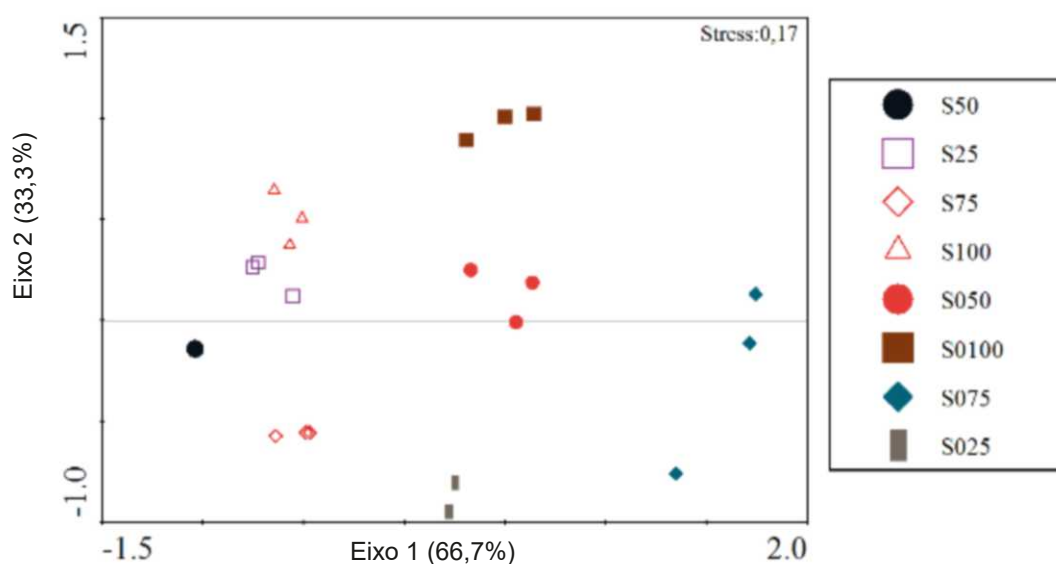
**Figura 9** - Dendrograma de similaridade do perfil de 16S rDNA gerado a partir da técnica de PCR-DGGE obtido dos tratamentos estudados (S25, S50, S75, S100 – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água; S025, S050, S075, S0100 – sem presença de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 142 dias de incubação do solo.



**Figura 10** - Dendrograma de similaridade do perfil de 16S rDNA gerado a partir da técnica de PCR-DGGE obtido dos tratamentos estudados (S25N0, S50N0, S75N0, S100N0 – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e sem adição de nitrogênio; S25N, S50N, S75N, S100N – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e com adição de nitrogênio; S025N0, S050N0, S075N0, S0100N0 – sem presença de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e sem adição de nitrogênio; S025N, S050N, S075N, S0100N – sem presença de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e com adição de nitrogênio) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 205 dias de incubação do solo.

Aos 142 dias, a ordenação gerada pelo NMDS agrupou as réplicas dos tratamentos com palha de maneira adjacente, enquanto que as dos tratamentos sem palha em porções equidistantes uns dos outros. Ainda, verifica-se 100% de reprodutibilidade das amostras do tratamento com 50% de umidade e com palha (Figura 11). A análise da estrutura das comunidades de bactérias mostrou que estas foram separadas devido ao fator palha, onde foram observados com a ANOSIM diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) com os valores de R de 0,32 e 0,59 nos níveis de palha 0 e 16 Mg ha<sup>-1</sup> respectivamente.

Esse resultado indicou que a diferenciação dos grupos bacterianos esteve mais relacionada a presença ou ausência da palha, o que difere de observações realizadas por Azevedo et al. (2015). Segundo Paredes Junior et al. (2015) efeitos benéficos podem ocorrer em decorrência da existência desse resíduo vegetal em cultivos de cana-de-açúcar são eles: aumento da matéria orgânica e provimento de energia e nutrientes aos microrganismos.

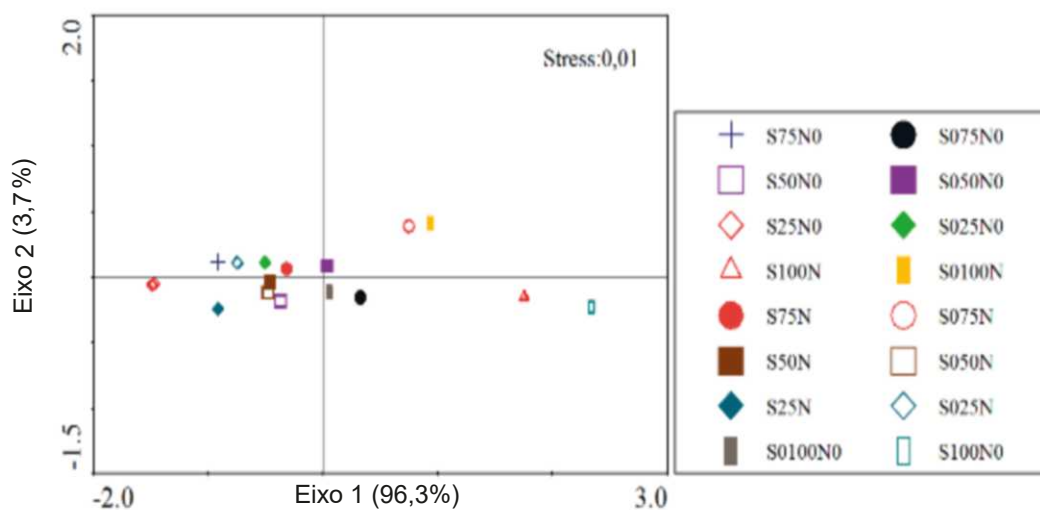


**Figura 11** – Ordenamento por NMDS dos perfis das comunidades bacterianas geradas a partir da técnica de PCR-DGGE de solo coletado dos tratamentos (S25, S50, S75, S100 – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água; S025, S050, S075, S0100 – sem presença de palha e 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 142 dias de incubação do solo.



Aos 205 dias, a ordenação gerada pelo NMDS agrupou as réplicas dos tratamentos de modo contíguo. Ainda, verifica-se 100% de reprodutibilidade em todas as amostras. A análise da estrutura das comunidades de bactérias mostrou que estas foram separadas devido especialmente ao fator palha, onde foram observados com a ANOSIM diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) com o valor de  $R = 1$  (Figura 12).

Conforme reportado por Liao et al. (2014) a adição da palhada confere melhoria das propriedades físico-biológicas e promoção no crescimento microbiano, o que conseqüentemente irá incrementar no desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar. Costa et al. (2014) em estudo sobre a estrutura das comunidades bacterianas associadas ao solo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, também observou diferenças na composição desses grupos bacterianos quando comparadas à microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar.



**Figura 12** - Ordenamento por NMDS dos perfis das comunidades bacterianas geradas a partir da técnica de PCR-DGGE de solo coletado dos tratamentos (S25N0, S50N0, S75N0, S100N0 – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e sem adição de nitrogênio; S25N, S50N, S75N, S100N – 16 Mg ha<sup>-1</sup> de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e com adição de nitrogênio; S025N0, S050N0, S075N0, S0100N0 – sem presença de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e sem adição de nitrogênio; S025N, S050N, S075N, S0100N – sem presença de palha, 25, 50, 75 e 100% da capacidade de retenção de água e com adição de nitrogênio ) de solo cultivado com cana-de-açúcar aos 205 dias de incubação do solo.

## 5.2 Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar sob efeito da temperatura

### 5.2.1 Propriedades microbiológicas do solo analisadas

Nas variáveis microbiológicas, aos 76 dias de incubação do solo, não foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) conforme Tabela 6. De acordo com Oliveira et al. (2014), trabalhos em condições de campo de breve duração, não apontaram diferenças nos atributos do solo com a mudança de sistema de colheita. E conforme os autores a deposição e acúmulo da palhada em períodos maiores poderá resultar em mudanças no sistema de manejo da cultura.

**Tabela 6** - Variáveis microbiológicas na ausência e presença de palhada aos 76 dias após incubação do solo <sup>(1)</sup>.

Palha	RBS	qCO <sub>2</sub>	CBM	NBM	C/Nmic
	µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg CO <sub>2</sub> µg CBM <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg g <sup>-1</sup> solo		
Sem	23,29a	0,04a	500,98a	51,06a	11,35a
Com	19,95a	0,05a	384,17a	46,69a	10,20a
CV (%)	32,04	23,09	42,91	49,37	63,81

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. RBS: respiração do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano.

Aos 168 dias de incubação do solo, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na variável nitrogênio da biomassa microbiana nas médias gerais dos tratamentos com palha e com nitrogênio, que apresentaram os maiores valores em relação aos tratamentos sem palha e sem nitrogênio, respectivamente. Na relação C/Nmic também foi verificado valor superior do tratamento com nitrogênio em comparação ao tratamento sem nitrogênio (Tabela 7).

Os valores de nitrogênio da biomassa microbiana foram semelhantes aos observados por Borges et al. (2014), que estudando o efeito do cultivo de cana-de-açúcar em sistemas orgânico e convencional nos atributos microbiológicas de latossolos do Cerrado, verificaram valor médio de 31,83 mg N kg<sup>-1</sup> de solo. Diferente do ocorrido aos 76 dias de incubação do solo, nota-se que a palha favoreceu no maior aporte de nutrientes à biomassa dos microrganismos, tanto para o nitrogênio quanto para o carbono. A presença do fertilizante nitrogenado também contribuiu na adição de

N à constituição celular da microbiota do solo. Zaman et al. (2002) ressaltam que o acréscimo dos substratos orgânicos associado a adubação nitrogenada, aumentam o nitrogênio da biomassa microbiana quando comparado a tratamentos sem a influência do resíduo orgânico.

Os dados da relação C/N microbiana foram superiores aos observados por Barreto et al. (2008) que obtiveram valores de 2,9. Devido a palha de cana-de-açúcar apresentar uma relação C/N = 100, a comunidade de microrganismos atuará na imobilização de N. Sendo assim uma maneira de diminuir essa indisponibilidade de nutrientes é aplicar nitrogênio durante a deterioração de resíduos com alta relação C/N (Assis et al., 2003), o que favorecerá a atuação biológica de decompositores primários, diminuindo a relação C/N da palhada de cana-de-açúcar (Smith, 1994).

**Tabela 7** – Variáveis microbiológicas em função das temperaturas, ausência e presença de palha e de nitrogênio aos 168 dias após incubação de solo <sup>(1)</sup>.

	RBS	qCO <sub>2</sub>	CBM	NBM	C/Nmic
	µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg CO <sub>2</sub> µg CBM <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg g <sup>-1</sup> solo		
<b>Palha</b>					
Sem	24,89 a	0,086 a	317,81 a	19,73 b	21,89 a
Com	25,53 a	0,082 a	421,79 a	31,82 a	20,63 a
<b>Nitrogênio</b>					
0 kg ha <sup>-1</sup>	26,95 a	0,085 a	376,88 a	17,46 b	12,18 b
100 kg ha <sup>-1</sup>	27,73 a	0,083 a	362,73 a	34,09 a	30,43 a
<b>Temperatura</b>					
20°C	26,38 a	0,086 a	373,63 a	24,41 a	24,28 a
30°C	24,19 a	0,082 a	365,98 a	27,14 a	18,25 a
CV (%)	21,52	46,71	55,38	46,28	90,64

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na linha na mesma fonte de variação não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. RBS: respiração do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano.

Quanto à respiração do solo, foi observado maior valor no tratamento com nitrogênio 100 kg ha<sup>-1</sup>, em relação ao tratamento sem nitrogênio na temperatura de 20°C. Na análise do desdobramento da palha x temperatura x nitrogênio foram observadas diferenças significativas nos tratamentos com palha 8 Mg ha<sup>-1</sup> e com ou sem nitrogênio, ambos na temperatura de 20°C (Tabela 8).

**Tabela 8** – Respiração do solo aos 168 dias após incubação do solo <sup>(1)</sup>.

CO <sub>2</sub> (µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )			
Temperatura (° C)	Palha (t ha <sup>-1</sup> )		
	0	8	
20	19,82 Aa	28,73 Aa	
30	23,96 Aa	12,53 Aa	
Temperatura (° C)	Nitrogênio (g)		
	0	100	
20	11,18 Ab	37,37 Aa	
30	13,18 Aa	23,31 Aa	
Palha (t ha <sup>-1</sup> )	Nitrogênio (g)		
	0	100	
0	14,28 Aa	29,51 Aa	
8	10,08 Aa	31,18 Aa	
Nitrogênio (g)	Temperatura (° C)	Palha (Mg ha <sup>-1</sup> )	
0	20	0	8
		11,89 Aa	10,48 Aa*
	30	16,68 Aa	9,69 Aa
100	20	0	8
		27,76 Aa	46,98 Aa*
	30	31,25 Aa	15,38 Aa
CV (%)		21,52	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.\*: inserido quando existe diferença significativa entre nitrogênio dentro de temperatura e palha.

Além de benefícios como proteção à ação de agentes erosivos e ciclagem de nutrientes, a presença da palhada garante conforto térmico à microbiota edáfica, assim trabalhos desenvolvidos por Graham et al. (2001), Robertson & Thorburn (2007) e Paredes Júnior et al. (2015), retratam a influência positiva desse resíduo vegetal ao aumento na atividade respiratória da biomassa microbiana. Ainda, é possível incrementar essa respiração microbiana, a partir da adição de adubação nitrogenada.

Moreira e Siqueira (2006) reportam que a microbiota do solo é estimulada à aplicação de nutrientes minerais igualmente como ocorre quando a matéria orgânica é adicionada.

Quanto ao carbono da biomassa microbiana não foi observado efeito dos tratamentos avaliados (Tabela 9) e assim como verificado no experimento de umidade, palha e nitrogênio é provável que a biomassa microbiana não estivesse estabilizada uma vez que não houve diferença significativa nos seus teores.

**Tabela 9** – Carbono da biomassa microbiana aos 168 dias após incubação do solo.

CBM ( $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo)			
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Palha ( $\text{t ha}^{-1}$ )		
	0	8	
20	297,98 Aa	449,28 Aa	
30	337,65 Aa	394,30 Aa	
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Nitrogênio (g)		
	0	100	
20	299,45 Aa	447,81 Aa	
30	454,30 Aa	277,65 Aa	
Palha ( $\text{t ha}^{-1}$ )	Nitrogênio (g)		
	0	100	
0	323,42 Aa	312,21 Aa	
8	430,33 Aa	413,26 Aa	
Nitrogênio (g)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Palha ( $\text{Mg ha}^{-1}$ )	
		0	8
0	20	267,94 Aa	330,95 Aa
	30	378,90 Aa	529,70 Aa
100	20	328,01 Aa	567,61 Aa
	30	296,40 Aa	258,90 Aa
CV (%)		55,38	

(1) Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.\* inserido quando existe diferença significativa entre nitrogênio dentro de umidade e palha.

Em relação ao quociente metabólico, também não foi observado efeito dos tratamentos avaliados (Tabela 10).

**Tabela 10** – Quociente metabólico aos 168 dias após incubação do solo.

$q\text{CO}_2$ ( $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g CBM}^{-1} \text{dia}^{-1}$ )			
Temperatura (° C)	Palha		
	0	8	
	(t ha <sup>-1</sup> )		
20	0,095 Aa	0,077 Aa	
30	0,077 Aa	0,088 Aa	
Temperatura (° C)	Nitrogênio		
	0	100	
	(g)		
20	0,105 Aa	0,067 Aa	
30	0,065 Aa	0,100 Aa	
Palha (t ha <sup>-1</sup> )	Nitrogênio		
	0	100	
	(g)		
0	0,088 Aa	0,083 Aa	
8	0,081 Aa	0,083 Aa	
Nitrogênio (g)	Temperatura (° C)	Palha (t ha <sup>-1</sup> )	
		0	8
0	20	0,110 Aa	0,100 Aa
	30	0,067 Aa	0,063 Aa
100	20	0,080 Aa	0,053 Aa
	30	0,087 Aa	0,113 Aa
CV (%)	46,71		

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.\* inserido quando existe diferença significativa entre nitrogênio dentro de umidade e palha.

Quanto ao nitrogênio da biomassa microbiana, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), nos tratamentos com palha  $8 \text{ Mg ha}^{-1}$ , e sem nitrogênio, ambos na temperatura de  $30^\circ\text{C}$  em relação aos tratamentos sem palha e com nitrogênio, respectivamente. Ainda, foi observado que na ausência de nitrogênio o tratamento com palha  $8 \text{ Mg ha}^{-1}$ , obteve maiores valores em relação aos tratamentos sem palha, e com nitrogênio  $100 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectivamente. Na análise do desdobramento da palha x temperatura x nitrogênio, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tratamento com palha  $8 \text{ Mg ha}^{-1}$ , em relação ao tratamento sem palha na temperatura de  $30^\circ\text{C}$  na ausência ou presença da adubação nitrogenada (Tabela 11).

Os resultados estão conforme os reportados por Schmidt et al. (2013), que, estudando a biomassa e atividade microbiana do solo em sistemas de produção olerícola orgânica, observaram valores médios de  $41,26 \text{ mg N kg}^{-1}$  de solo. Verifica-se nesse estudo que a adição da adubação nitrogenada foi preponderante na imobilização de nitrogênio pelas populações microbianas, estando aliada também ao período de incubação e a permanência da palhada sob o solo. Coser et al. (2007), constataram que doses acima de  $90 \text{ kg N ha}^{-1}$  não elevam o nitrogênio da biomassa microbiana. Delbem et al. (2011), verificaram que altas doses de fertilizante nitrogenado na forma de sulfato de amônio, geraram efeitos negativos sobre a microbiota do solo, reduzindo a biomassa microbiana e aumentando o nível de estresse.

A temperatura também contribuiu na fixação de N à biomassa dos microrganismos, onde associada a presença de resíduos orgânicos com alta relação C:N, como é caso da palha de cana-de-açúcar, propiciou condições favoráveis as comunidades microbianas do solo.

**Tabela 11** - Nitrogênio da biomassa microbiana aos 168 dias após incubação do solo<sup>(1)</sup>.

NBM ( $\mu\text{g N g}^{-1}$ solo)			
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Palha ( $\text{t ha}^{-1}$ )		
	0	8	
20	21,48 Aa	27,35 Aa	
30	17,98 Ab	36,30 Aa	
Nitrogênio			
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Nitrogênio (g)		
	0	100	
20	30,47 Aa	18,36 Aa	
30	37,73 Aa	16,56 Ab	
Nitrogênio			
Palha ( $\text{t ha}^{-1}$ )	Nitrogênio (g)		
	0	100	
0	25,74 Ba	13,72 Aa	
8	42,45 Aa	21,20 Ab	
Nitrogênio (g)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Palha ( $\text{t ha}^{-1}$ )	
0	20	0	8
		27,09 Aa	33,84 Aa
	30	24,39 Ab	51,07 Aa*
		0	8
100	20	15,87 Aa	20,86 Aa
	30	11,58 Aa	21,54 Aa*
CV (%)		46,28	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.\* inserido quando existe diferença significativa entre nitrogênio dentro de temperatura e palha.

Foram realizadas análises de correlações entre as variáveis avaliadas e observou-se que aos 76 dias houve correlação significativa positiva entre respiração basal x carbono da biomassa microbiana ( $r = 0,86$ ) e carbono da biomassa microbiana x relação c/n microbiana ( $r = 0,87$ ). Aos 168 dias houve correlação significativa positiva



entre a respiração basal x quociente metabólico ( $r = 0,71$ ) e correlações significativas negativas entre respiração basal x relação c/n microbiana ( $r = - 0,47$ ), carbono da biomassa microbiana x quociente metabólico ( $r = - 0,74$ ), quociente metabólico x relação c/n microbiana ( $r = - 0,47$ ) e nitrogênio da biomassa microbiana x relação c/n microbiana ( $r = - 0,60$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12** - Matriz de correlação linear simples entre os atributos microbiológicos <sup>(1)</sup>.

76 dias					
	RBS	CBM	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic
RBS	1,00				
CBM	0,86*	1,00			
qCO <sub>2</sub>	-0,06	-0,55	1,00		
NBM	-0,07	-0,35	0,58	1,00	
C/Nmic	0,61	0,87*	-0,71	-0,75	1,00
168 dias					
	RBS	CBM	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic
RBS	1,00				
CBM	-0,25	1,00			
qCO <sub>2</sub>	0,71**	-0,74**	1,00		
NBM	0,13	0,37	-0,09	1,00	
C/Nmic	-0,47*	0,21	-0,47*	-0,60**	1,00

<sup>(1)</sup> RBS: respiração do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano. Valor seguido por (\*) e (\*\*) e indica diferença significativa a 5 e 1% de probabilidade pelo teste t.

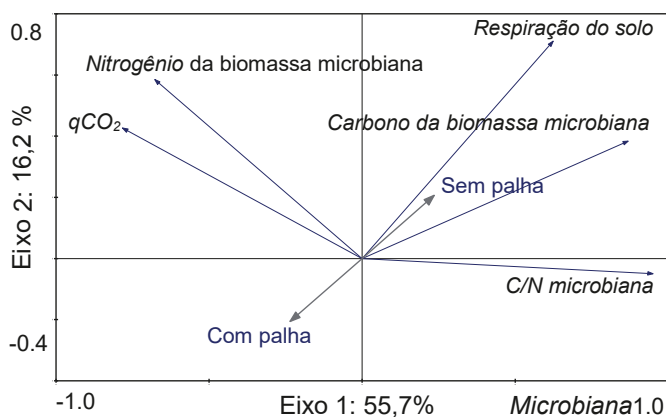
A correlação positiva entre a respiração basal e o carbono da biomassa microbiana pode ser explicada pelo fato da atividade microbiana ter sido incrementada pelo carbono microbiano. Assim é possível constatar que a microbiota edáfica consumiu maiores quantidades de carbono que o suportado pelo solo a partir de sua biomassa (CBM), especialmente na ausência do substrato vegetal, desencadeando extenuação na comunidade microbiana e conforme Anderson e Domsch (1993), provavelmente representa instabilidade energética no grupamento microbiano como consequência da perturbação ecossistêmica. Em trabalhos realizados por Santos et al. (2004), Delbem et al. (2011) e Sousa et al. (2014) também foram observadas a referida relação. Já a alta correlação entre o carbono da biomassa microbiana e a taxa c/n microbiana pode ter ocorrido em função de um equilíbrio entre a fixação de

carbono à biomassa e a mineralização desse nutriente ao ambiente. Dessa forma, percebe-se que a palhada pode ter favorecido a estabilidade do processo de ciclagem do carbono. O estudo desenvolvido por Monteiro e Gama-Rodrigues (2004) corrobora aos dados apresentados nessa pesquisa, já que os autores também obtiveram correlação positiva entre o CBM e a razão C/Nmic.

A correlação da respiração do solo e o  $qCO_2$  pode ser elucidada em função dos tratamentos onde o solo esteve desnudo, o que desencadeou em incremento respiratório pelos microrganismos. Observa-se ainda que quando a microbiota foi exposta a uma ambiência instável (falta de palhada e adição de nitrogênio ao solo), houve menor atuação na mineralização de C e N dos tecidos da microbiota edáfica e aumento do gasto metabólico, representado pelas correlações negativas entre a relação C/N microbiana, a respiração basal e o quociente metabólico. A ausência da palhada, provavelmente provocou a criação de ambiente com baixa umidade, sendo assim adverso ao equilíbrio microbiano do solo, fato este observado a partir da correlação negativa entre o  $qCO_2$  e o carbono da biomassa microbiana. Os resultados de Almeida et al. (2009), estudando diferentes coberturas em pomar orgânico de maçã no sul brasileiro, corroboram com os verificados nesse trabalho.

Os indicadores microbiológicos foram relacionados às variáveis ambientais, ou seja, aos tratamentos aplicados no experimento (com e sem palha). Em relação à variância explicada, o eixo 1 explicou 55,7% da variabilidade dos dados, onde o quociente metabólico não se correlacionou com a presença ou ausência da palha. Já o nitrogênio da biomassa microbiana obteve uma pequena relação com a presença da palha aos 76 dias. Esse fato pode estar relacionado ao incremento de nitrogênio que a microbiota do solo recebeu da palha. Ainda, a respiração do solo, a relação C/N microbiana e o carbono da biomassa microbiana se correlacionaram com a ausência de palha, sendo a respiração com o maior grau de correlação (Figura 13).

Nos ecossistemas agrícolas, as maiores perdas de carbono para a atmosfera ocorrem em solos desnudos, assim a falta do resíduo vegetal pode ter ocasionado essa alta relação entre a respiração do solo ao tratamento sem palha. Já a relação do carbono da biomassa microbiana e da relação C/N microbiana à inexistência do resíduo, possa ser decorrente da maior incorporação do carbono orgânico do solo às células dos microrganismos, bem como o aumento na mineralização da matéria orgânica do solo. Entretanto estudos mais aprofundados e de longo prazo são importantes, visto que possibilitarão prever informações detalhadas dessa dinâmica do carbono e do nitrogênio, especialmente em situações como as mencionadas nesse trabalho.



**Figura 13** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos avaliados em solo cultivado com cana-de-açúcar sob efeito de ausência e presença de palhada aos 76 dias após incubação do solo.

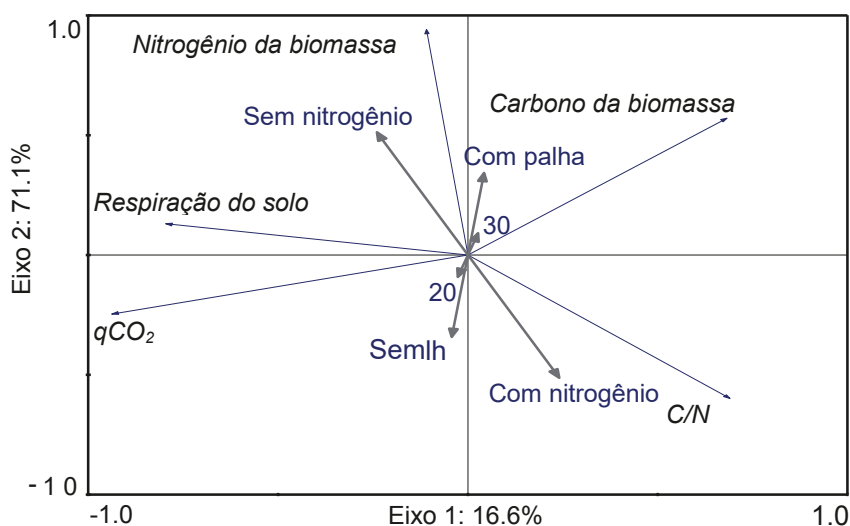
Aos 168 dias, os indicadores microbiológicos foram correlacionados às variáveis ambientais, ou seja, aos tratamentos aplicados no experimento (temperaturas – 20 e 30°C, com e sem palha e com e sem nitrogênio). Em relação à variância explicada, o eixo 1 explicou 16,6% da variabilidade dos dados, onde separou os tratamentos com palha e temperatura de 30°C em um bloco, dos tratamentos sem palha e temperatura de 20°C em um outro bloco. Ainda, a análise da PCA revelou que o carbono da biomassa microbiana se correlacionou bastante com a presença da palha e com a temperatura de 30°C, que também estavam bastante correlacionados entre si. Já a variável C/N microbiana foi mais correlacionada a presença do nitrogênio. Enquanto o nitrogênio da biomassa microbiana foi correlacionado com o tratamento com palha. A respiração do solo e qCO<sub>2</sub> foram bastante correlacionados entre si e na ausência de nitrogênio. A ausência da palha e à temperatura de 20°C também foram altamente correlacionados entre si e por sua vez se correlacionaram à respiração do solo e ao qCO<sub>2</sub> (Figura 14).

Moitinho et al. (2013), destaca que a manutenção da palhada de cana-de-açúcar garante a diminuição da temperatura e preserva o conteúdo de água no solo, promovendo aumento no teor da matéria orgânica, sendo assim observa-se que a incorporação de carbono à biomassa microbiana foi influenciada pela presença do resíduo vegetal e temperatura adequada. De acordo com Mendonza et al. (2000), é provável que a biomassa microbiana encontrou condições favoráveis em decorrência do abundante substrato para o seu crescimento na palha. Paredes Júnior et al. (2015)

verificaram que a manutenção da palhada de cana-de-açúcar beneficiou a atividade microbiana do solo.

Na relação C:N microbiana, percebe-se que essa foi favorecida pela presença do nitrogênio via fertilização, onde segundo Vargas et al. (2004) tal comportamento é consequência do N disponível. Quanto ao nitrogênio da biomassa a relação com a manutenção da palhada é explicada por Muller et al. (2014), que informam que a adjunção de fontes de carbono ou nitrogênio pode elevar a biomassa. A estrutura da microbiota do solo reflete diretamente o potencial da imobilização de N, onde essa proporção é variável entre espécies e grupos microbianos (Machado et al., 2012).

A correspondência entre a respiração do solo e o  $qCO_2$ , bastante discutida na literatura (Moreira e Siqueira, 2006; Araújo e Monteiro, 2007; Porto et al., 2009; Ananyeva et al., 2016), reforça as informações obtidas no presente estudo, onde à medida que a biomassa excede seu gasto metabólico, como resultado de perda de carbono pela atividade biológica, maior será a energia para preservação das funções vitais da célula microbiana, ou seja, estando intimamente relacionada a situação hostil, provocada pelas condições do ambiente edáfico, tais como a escassez de substrato. Quando se analisa uma constituição análoga das populações microbianas, constata-se uma eficiência da biomassa e assim uma baixa alíquota respiratória, conforme Alves et al. (2011) e Borges et al. (2014).



**Figura 14** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos avaliados em solo cultivado com cana-de-açúcar e sob efeito de palha, temperatura e nitrogênio aos 168 dias após incubação do solo.

## **Parte II: Amostragem de solo em experimento de campo**

### **5.3 Propriedades microbiológicas em latossolos cultivados com de cana-de-açúcar**

#### **5.3.1 Atributos microbiológicos do solo analisados**

Na área 1 não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos e as profundidades estudadas no carbono da biomassa microbiana, no quociente metabólico, na relação C/N e na estimativa do número de nitratores (Tabela 13).

Na respiração do solo (RBS), as concentrações variaram de 27,52 a 31,90  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  na profundidade de 0-10 cm e de 23,05 a 22,68  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  na profundidade de 10-20 cm. Foram observadas diferenças significativas no tratamento sem adubação nitrogenada na profundidade de 0-10 cm em relação à profundidade de 10-20 cm (Tabela 13), assim nota-se que esse atributo não foi influenciado pela presença do adubo nitrogenado. De acordo com Ramos et al. (2010) é provável que a falta da fertilização contribuiu na minimização da perturbação gerada pela adubagem e assim a comunidade microbiana foi supostamente incrementada pelos exsudados radiculares liberados pela cultura.

Em relação ao nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), as concentrações variaram de 61,49 a 39,92  $\mu\text{g N g}^{-1}$  solo na profundidade de 0-10 cm e de 19,30 a 33,45  $\mu\text{g N g}^{-1}$  solo na profundidade de 10-20 cm, onde foram observadas diferenças significativas no tratamento com adubação nitrogenada na profundidade de 0-10 cm em relação à profundidade de 10-20 cm (Tabela 13). Em solo cultivado com cana-de-açúcar sob diferentes manejos, Evangelista et al. (2013) obtiveram valores de NBM variando de 27,50 a 107,5  $\text{mg kg}^{-1}$ , bem superiores aos observados neste trabalho. De acordo com o referido autor, a biomassa microbiana apresenta-se como parte relevante do nitrogênio total do solo passível de mineralização e assim quanto mais elevado for o teor desse nitrogênio microbiano, mais ágil será sua remineralização. Conforme reportado por Lopes et al. (2011) e Zaman et al. (2002), acréscimo de resíduos orgânicos e simultaneamente com fertilizantes nitrogenados, elevam o nitrogênio da microbiota quando comparado a tratamentos com ausência desses fatores, após o primeiro ano de adubação.

Quanto ao número mais provável de microrganismos amonificadores foram evidenciadas diferenças significativas, com maiores números de amonificadores na profundidade de 10-20 cm em relação à profundidade de 0-10 cm, independente da presença ou ausência da adubação nitrogenada (Tabela 13). Em relação ao número mais provável de microrganismos nitratores foram observadas diferenças significativas, onde houve um maior valor no tratamento sem adubação nitrogenada

em relação ao tratamento com adubação nitrogenada na profundidade de 10-20 cm. Também, no tratamento com adubação nitrogenada foi verificado maior número de nitrificadores na profundidade de 0-10 cm em relação à profundidade de 10-20 cm. (Tabela 13).

Observou-se que os amonificadores tiveram seu desenvolvimento mesmo com a falta do fertilizante nitrogenado e dessa forma é provável que essa população estivesse em condições de pleno estabelecimento, em função da presença de quantidades adequadas de nitrogênio ao solo. Ainda, segundo Matos (2006), já que os amonificadores são capazes de converter o N-orgânico em  $N-NH_4^+$ , um rápido incremento desse grupo de organismos deve ser facultado a uma baixa porcentagem de N-orgânico incorporado ao solo. Quanto aos organismos nitrificadores constatou-se que esses foram incrementados em decorrência do amônio presente em doses apropriadas ao crescimento dessa comunidade, o que pode ter inviabilizado no desenvolvimento satisfatório de nitrificadores, visto que foram observados baixos números. Conforme destacado por Dias (2016), a oxidação da amônia é vista como a fase restritiva para a rapidez da nitrificação na maior parte dos sistemas, já que o nitrito ocasionalmente concentra-se no ambiente. Ainda, a etapa da nitratação decorre mais velozmente do que o da nitrificação, isso também favorece para o não-armazenamento do nitrito no solo.

Na Área 2, não foram constadas diferenças significativas entre os tratamentos e as profundidades estudadas nos atributos estudados (Tabela 14).

**Tabela 13** – Valores médios de carbono da biomassa microbiana (cbm), respiração basal do solo (rbs), quociente metabólico (qm), nitrogênio da biomassa microbiana (nbm), relação carbono e nitrogênio microbiano (c/nmic), amonificadores (amo), nitrificadores (nitri) e nitratores (nitra) nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm na Área 1.

Área 1									
	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
Nitrogênio	µg C g <sup>-1</sup> solo	µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg CO <sub>2</sub> µg CBM <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg N g <sup>-1</sup> solo			log NMP.g <sup>-1</sup> solo		
	0-10 cm								
Com	246,02Aa±30,75	27,52Aa±5,01	0,11Aa±0,03	61,49Aa±54,16	6,29Aa±4,04	2,3Ab±2,32	3,1Aa±3,14	0,22Aa±0,37	
Sem	233,55Aa±146,75	31,90Aa±7,50	0,18Aa±0,12	39,92Aa±10,02	5,64Aa±2,79	2,2Ab±2,28	2,8Aa±2,85	0,09Aa±0,04	
	10-20 cm								
Com	184,86Aa±42,67	23,05Aa±5,85	0,13Aa±0,03	19,30Ab±6,15	9,86Aa±2,19	3,2Aa±3,23	2,1Bb±2,15	0,61Aa±0,51	
Sem	225,29Aa±94,06	22,68Ab±5,66	0,11Aa±0,04	33,45Aa±18,79	7,43Aa±1,94	2,8Aa±2,81	3,3Aa±3,36	0,12Aa±0,16	
CV (%)	35,3	19,5	51,1	63,5	30,7	11,6	18,9	130,2	

(<sup>1</sup>) Médias seguidas por mesma letra (maiúscula compara tratamento e minúscula compara profundidade) na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 14** – Valores médios de carbono da biomassa microbiana (cbm), respiração basal do solo (rbs), quociente metabólico (qm), nitrogênio da biomassa microbiana (nbm), relação carbono e nitrogênio microbiano (c/nmic), amonificadores (amo), nitrificadores (nitri) e nitratores (nitra) nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm na Área 2.

Área 2									
Nitrogênio	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
	µg C g <sup>-1</sup> solo	µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg CO <sub>2</sub> µg CBM <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	µg N g <sup>-1</sup> solo			log NMP.g <sup>-1</sup> solo		
									0-10 cm
Com	345,89Aa±148,49	20,09Aa±4,15	0,07Aa±0,04	61,73±20,72Aa	6,63Aa±4,42	4,55Aa±0,14	2,63Aa±0,73	0,26Aa±0,36	
Sem	353,04Aa±41,59	17,53Aa±1,04	0,05Aa±0,01	42,13±13,05Aa	8,78Aa±1,77	4,55Aa±0,15	2,27Aa±0,50	0,27Aa±0,19	
									10-20 cm
Com	421,08Aa±217,30	33,69Aa±18,24	0,11Aa±0,11	46,06±11,95Aa	10,49Aa±7,65	4,74Aa±0,37	2,46Aa±0,70	0,22Aa±0,28	
Sem	353,17Aa±74,87	26,86Aa±1,76	0,08Aa±0,02	40,00±18,86Aa	11,84Aa±9,02	4,54Aa±0,15	2,58Aa±0,41	0,24Aa±0,27	
CV (%)	36,0	40,7	75,7	30,6	51,9	5,31	24,9	91,1	

(<sup>1</sup>) Médias seguidas por mesma letra (maiúscula compara tratamento e minúscula compara profundidade) na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Também foram realizadas análises de correlações entre as variáveis avaliadas e observou-se que na Área 1 houve correlação significativa positiva entre o carbono da biomassa microbiana x nitrogênio da biomassa microbiana ( $r = 0,77$ ) na camada de 10-20 cm e correlações significativas negativas entre o carbono da biomassa microbiana x quociente metabólico ( $r = -0,80$ ) e ( $r = -0,83$ ) nas camadas de 0-10 cm e 10-20 cm respectivamente. Foram observadas também correlações significativas negativas entre o nitrogênio da biomassa microbiana x relação C/N microbiana ( $r = -0,77$ ), relação C/N microbiana x nitritadores ( $r = -0,74$ ) e nitritadores x nitratores ( $r = -0,75$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Matriz de correlação linear simples entre os atributos microbiológicos na área 1 <sup>(1)</sup>.

		0 - 10 cm							
	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
CBM	1,00								
RBS	-0,22	1,00							
qCO <sub>2</sub>	-0,80*	0,50	1,00						
NBM	0,03	-0,09	-0,18	1,00					
C/Nmic	0,68	-0,40	-0,60	-0,59	1,00				
AMO	0,33	0,38	0,03	-0,26	0,36	1,00			
NITRI	-0,50	0,19	0,26	-0,02	-0,46	-0,22	1,00		
NITRA	0,21	-0,45	-0,30	-0,25	0,62	0,29	-0,58	1,00	
		10 - 20 cm							
	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
CBM	1,00								
RBS	0,38	1,00							
qCO <sub>2</sub>	-0,83*	0,12	1,00						
NBM	0,77*	0,45	-0,58	1,00					
C/Nmic	-0,28	0,03	0,37	-0,77*	1,00				
AMO	-0,13	0,40	0,13	0,03	-0,05	1,00			
NITRI	0,20	0,25	0,00	0,65	-0,74*	-0,15	1,00		
NITRA	-0,14	-0,04	0,07	-0,44	0,62	-0,08	-0,75*	1,00	

<sup>(1)</sup> RBS: respiração do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano; AMO: amonificadores; NITRI: nitritadores; NITRA: nitratores. Valor seguido por (\*) e (\*\*) e indica diferença significativa a 5 e 1% de probabilidade pelo teste t.

Na Área 2 houve correlação significativa positiva entre a respiração basal x quociente metabólico ( $r = 0,98$ ) e correlações significativas negativas entre carbono da biomassa microbiana x quociente metabólico ( $r = - 0,73$ ), nitrogênio da biomassa microbiana x relação C/N microbiana ( $r = - 0,91$ ) e nitritadores x nitratores ( $r = - 0,86$ ) na camada de 10-20 cm.

**Tabela 16** - Matriz de correlação linear simples entre os atributos microbiológicos na área 2 <sup>(1)</sup>.

		0 -10 cm							
	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
CBM	1,00								
RBS	-0,08	1,00							
qCO <sub>2</sub>	-0,78	0,65	1,00						
NBM	-0,38	0,30	0,62	1,00					
C/Nmic	0,65	-0,03	-0,64	-0,91	1,00				
AMO	0,06	0,43	0,27	0,41	-0,26	1,00			
NITRI	0,28	-0,45	-0,47	-0,22	0,19	-0,44	1,00		
NITRA	-0,59	0,47	0,77	0,65	-0,66	0,45	-0,76	1,00	
		10 - 20 cm							
	CBM	RBS	qCO <sub>2</sub>	NBM	C/Nmic	AMO	NITRI	NITRA	
CBM	1,00								
RBS	-0,70	1,00							
qCO <sub>2</sub>	-0,73*	0,98**	1,00						
NBM	-0,25	0,50	0,45	1,00					
C/Nmic	0,53	-0,50	-0,50	-0,91**	1,00				
AMO	-0,22	-0,07	-0,10	-0,19	-0,05	1,00			
NITRI	0,32	-0,50	-0,44	-0,47	0,37	0,02	1,00		
NITRA	-0,31	0,30	0,19	0,27	-0,21	0,19	-0,86**	1,00	

<sup>(1)</sup> RBS: respiração do solo; CBM: carbono da biomassa microbiana; qCO<sub>2</sub>: quociente metabólico; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nmic: relação carbono/nitrogênio microbiano; AMO: amonificadores; NITRI: nitritadores; NITRA: nitratores. Valor seguido por (\*) e (\*\*) e indica diferença significativa a 5 e 1% de probabilidade pelo teste t.

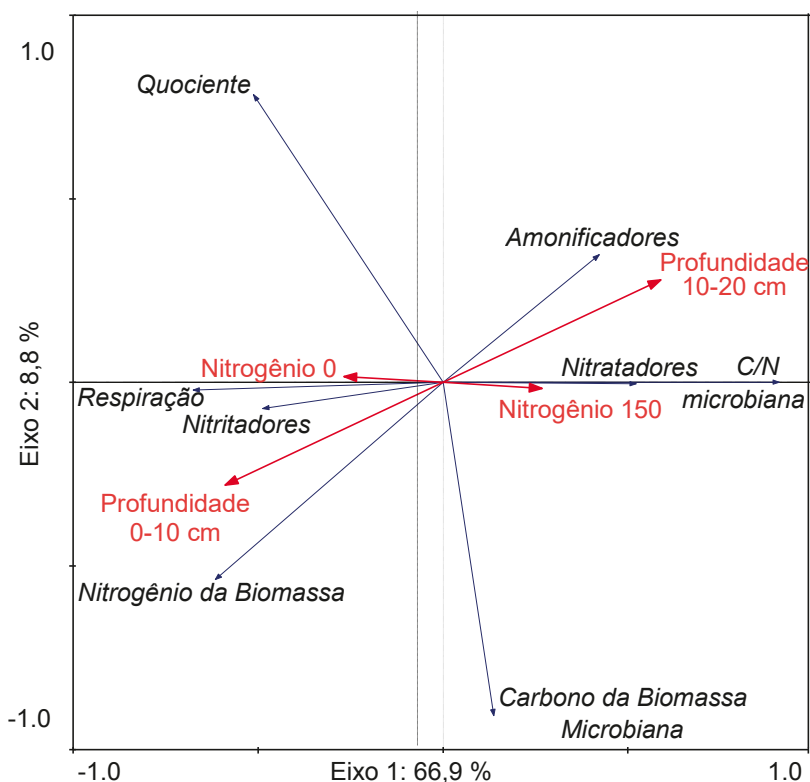
A correlação entre o carbono da biomassa microbiana e o nitrogênio da biomassa microbiana talvez tenha ocorrido em função do equilíbrio na incorporação desses componentes aos tecidos da microbiota do solo, que por sua vez provavelmente diminuiu sua taxa respiratória específica em decorrência da

imobilização de carbono, representado pela correlação negativa entre o carbono da biomassa microbiana e o quociente metabólico em ambas as camadas do solo. Mesmo comportamento foi observado na correlação negativa entre o nitrogênio da biomassa microbiana e a relação C/N microbiana, já que o nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana, reduziu a mineralização desse elemento. Ainda, percebe-se que a fixação desse nitrogênio aparentemente interferiu na razão C/N microbiana correlacionando-se negativamente com os organismos nitrificadores. Também foram observadas correlações negativas entre grupos microbianos, exemplificada pela maior atuação de nitrificadores em relação aos nitratores, podendo ser explicada por alguma instabilidade ambiental que provocou acréscimo de amônio e redução do nitrato, ocorrendo assim a sobreposição de um nicho entre as populações microbianas. Em trabalho utilizando diferentes coberturas do solo na produção orgânica de maçã, Almeida et al. (2009) constataram correlação positiva entre o NBM e o CBM ( $r = 0,7$ ). A alta correlação positiva verificada entre a respiração basal e o quociente metabólico pode estar relacionada a aplicação da adubação nitrogenada que favoreceu uma elevada produtividade no sistema e assim contribuiu na atividade microbiana do solo. Apolari (2016), estudando a qualidade do solo agrícola cultivado com cana-de-açúcar comparando o uso de insumos convencionais e orgânicos, também verificou alta correlação positiva entre a RBS e  $qCO_2$  ( $r = 0,87$ ).

Na área 1, através da PCA foi verificado que o eixo 1 diferenciou a adubação nitrogenada e a profundidade, explicando 66,9% da variabilidade dos dados, onde a profundidade foi que melhor explicou essa variação. Verificou-se que a profundidade de 10-20 cm e com adubação nitrogenada foram relacionadas entre si. Nas variáveis de resposta que são os dados microbiológicos, foi observado que a relação C/N microbiana, os organismos amonificadores e nitratores e o carbono da biomassa microbiana se correlacionaram bastante com a profundidade de 10-20 cm e na presença de nitrogênio, enquanto que a respiração, o nitrogênio da biomassa microbiana, o quociente metabólico e nitratores correlacionaram-se com a profundidade de 0-10 cm e na ausência de nitrogênio (Figura 15).

A fertilização nitrogenada provavelmente impulsionou a fixação de nitrogênio na biomassa microbiana e com isso beneficiou o crescimento dos organismos amonificadores e nitratores, presumivelmente pela deposição desse elemento amônio e nitrato na profundidade de 10-20 cm. Ainda, percebe-se que a microbiota do solo também disponibilizou nutrientes, já que houve relação entre a razão C/N microbiana e o carbono da biomassa microbiana. Sobre a correlação da respiração e do quociente metabólico, é possível que ambos os atributos sofreram estresse em

função da ausência da adubação nitrogenada, o que também não favoreceu a imobilização desse elemento nos tecidos microbianos da comunidade presente na profundidade de 0-10 cm e assim prejudicando o desenvolvimento dos nitritadores.

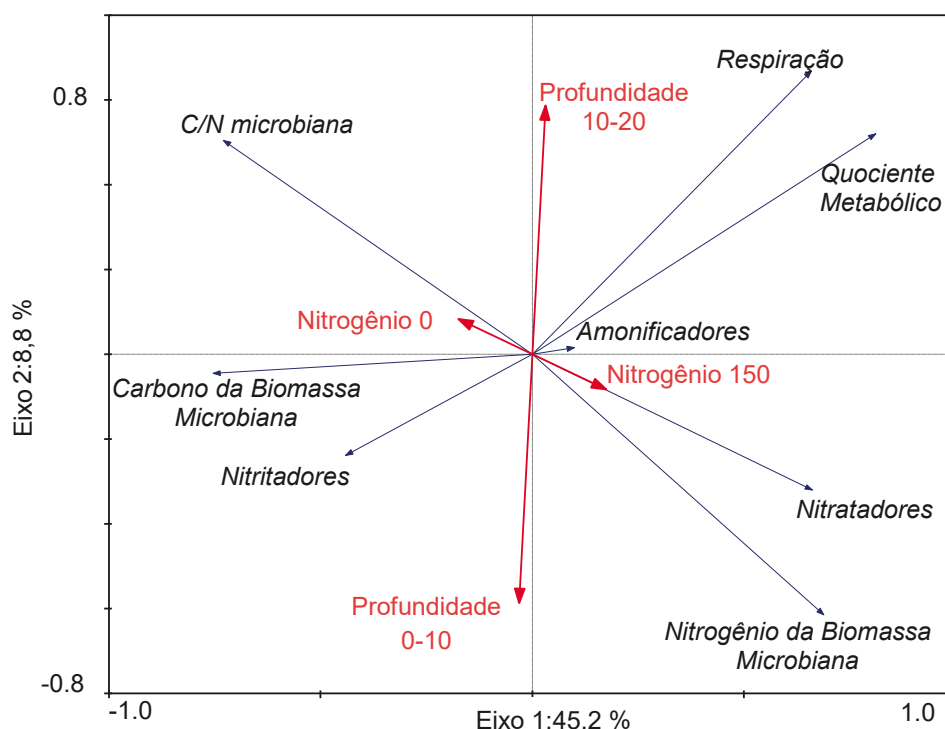


**Figura 15** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos avaliados em solo sob cultivo de cana-de-açúcar na área 1.

Já na área 2, foi observado na PCA que o eixo 1 explicou 42,5% da variabilidade dos dados, onde a profundidade foi que melhor explicou essa variação. Nas variáveis microbiológicas, foi observado que a respiração basal, o quociente metabólico, o nitrogênio da biomassa microbiana e os nitratadores se correlacionaram bastante com a profundidade de 10-20 cm e na presença de adubação nitrogenada, enquanto que a relação C/N microbiana, o carbono da biomassa microbiana, e os nitritadores correlacionaram-se com a profundidade de 0-10 cm e na ausência de nitrogênio (Figura 16).

A presença da adubação nitrogenada possivelmente influenciou na imobilização de nitrogênio pela biomassa microbiana e também favoreceu o

desenvolvimento de organismos nitratores, possivelmente pelo acúmulo desse nutriente na camada de 10-20 cm. Ainda, a respiração do solo e o quociente metabólico foram altamente correlacionados, demonstrando que a microbiota provavelmente liberou mais energia para conservar uma menor biomassa. Sobre a correspondência do carbono da biomassa microbiana e da relação C/N microbiana à falta da fertilização nitrogenada, pode ser explicada em virtude do maior incremento do carbono orgânico do solo aos tecidos microbianos em detrimento do nitrogênio, ocasionando certo desequilíbrio na ciclagem de nutrientes. Esse fato possivelmente interferiu negativamente a mineralização da matéria orgânica do solo.



**Figura 16** - Análise de componentes principais dos indicadores microbiológicos avaliados em solo sob cultivo de cana-de-açúcar na área 2.

Em geral sabe-se que a adoção da fertilização nitrogenada nos cultivos agrícolas promove aumento na biomassa microbiana do solo, garantindo uma reserva nutricional aos micro-organismos, em especial aqueles ligados ao ciclo do N. Dessa forma conforme Perez et al. (2005), a biomassa microbiana é um reservatório essencial do nitrogênio potencialmente mineralizável, sendo assim quanto superior for o teor de N na biomassa microbiana, mais veloz será a sua reciclagem.

Segundo Assis et al. (2003), o  $qCO_2$  é dito como a razão da respiração intrínseca da biomassa microbiana, onde elevados valores são detectados em

situações adversas à comunidade microbiana, onde os microrganismos edáficos agem mais intensamente para manterem sua atividade, sendo que condições como esta podem acontecer em arranjos recentes ou que tiveram incremento atual de substrato, comportamento este observado no presente trabalho.

Quanto às análises das enzimas realizadas na área 2, foram observadas diferenças apenas na desidrogenase, sendo que as concentrações variaram de 67,5 a 79,4  $\mu\text{g TTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$  na profundidade de 0-10 cm e de 91,1 a 124,3  $\mu\text{g TTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$  na profundidade de 10-20 cm. Foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no tratamento sem adubação nitrogenada, onde a profundidade de 10-20 cm apresentou valor superior ao visualizado na profundidade 0-10 cm (Tabela 17).

Verifica-se que a atividade enzimática da desidrogenase foi estimulada tanto pela presença quanto pela ausência do nitrogênio nas camadas de 0-10 e 10-20 cm, respectivamente e assim é possível inferir que existe uma ligação entre a atuação da enzima e as comunidades microbianas presentes nos tratamentos citados, já que conforme reporta Pupin e Nahas (2011), a desidrogenase é uma enzima importante na atividade metabólica intracelular em células viáveis, estando envolvida em processos respiratórios microbianos e podendo estar relacionada ao crescimento microbiano. Esses mesmos autores observaram que em sucessivos cortes da cana-de-açúcar houve redução da atividade da desidrogenase, sendo este resultado correspondente com as respostas obtidas das contagens de microrganismos e da biomassa microbiana. Dessa forma, é provável que a atividade enzimática diminuída esteja ligada à diminuição da comunidade microbiana, observada nesse estudo.

**Tabela 17** - Atividade das enzimas desidrogenase, protease e fosfatase alcalina, em solo sob cultivo de cana-de-açúcar na área 2<sup>(1)</sup>.

Profundidade (cm)	Desidrogenase ( $\mu\text{g TTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		Protease ( $\mu\text{g Tirosina g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		Fosfatase alcalina ( $\mu\text{g p-NPP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	
	Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )		Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )		Nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ )	
	0	150	0	150	0	150
0-10	67,5 Ba	79,4 Aa	23,3 Aa	22,8 Aa	541,8 Aa	480,6 Aa
10-20	124,3 Aa	91,1 Aa	25,4 Aa	23,9 Aa	697,8 Aa	587,8 Aa
CV (%)	29,9		14,1		25,8	

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 6 CONCLUSÕES

No experimento em condições controladas, com diferentes umidades, com adição ou não de palha, e com aplicação ou não de nitrogênio, a respiração basal do solo e o  $qCO_2$  foram influenciados pelo incremento das umidades, especialmente pela umidade 100% nos dois períodos de incubação do solo. O nitrogênio da biomassa microbiana se correlacionou com a palha, independente da adição de adubação nitrogenada. O carbono da biomassa microbiana não foi influenciado pelos tratamentos aplicados no experimento realizado em ambas as épocas de avaliação. O perfil das comunidades bacterianas revelou uma alta correlação da umidade e da palha em possíveis mudanças na composição microbiana, principalmente na umidade 100%.

No experimento em condições controladas, com diferentes temperaturas, com adição ou não de palha, e com aplicação ou não de nitrogênio, a respiração do solo e a razão C/N foram correlacionadas a ausência de palha e influenciadas pela presença de adubação nitrogenada na temperatura de 20°C. O carbono da biomassa microbiana foi influenciado pela presença da palha e pela temperatura de 30°. De modo geral, o nitrogênio da biomassa microbiana foi influenciado primeiramente pela presença da palha e secundariamente pela adubação nitrogenada.

Nos experimentos em condições de campo, a respiração basal foi o indicador mais sensível em relação à mudança na profundidade na área 1, enquanto o carbono da biomassa microbiana, o quociente metabólico e os nitratores não foram influenciados pela aplicação dos tratamentos nas áreas estudadas. Os nitratores foram correlacionados a ausência de nitrogênio na profundidade de 0,0-10,00 cm, enquanto os nitratores e os amonificadores se relacionaram ao tratamento com adubação nitrogenada na profundidade de 10,0 – 20,0 cm independente da área avaliada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Protease activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 313-315.

ALMEIDA, D.; KLAUBERG FILHO, O.; FELIPE, A.F.; ALMEIDA, H.C. Carbono, nitrogênio e fósforo microbiano do solo sob diferentes coberturas em pomar de produção orgânica de maçã no sul do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 1069-1077, 2009.

ALMEIDA, R.F.; NAVE, E. R.; SILVEIRA, C. H.; WENDLING, B. Emissão de gás de efeito estufa, óxido nitroso, em solos com diferentes usos e manejos: uma revisão. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 8, n.2, p. 441-461, 2015.

ALVES, T. D. S.; CAMPOS, L. L. NETO, N. E.; MATSUOKA, M.; LOUREIRO, M. F. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 341-347, 2011.

AMARAL, H. F.; SENA, J. O. A.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; BALOTA, E. L.; ANDRADE, D.S. Soil chemical and microbial properties in vineyards under organic and conventional management in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1517-1526, 2011.

AMARAL, H. F.; SENA, J. O.A.; ANDRADE, D.S.; JÁCOME, A.G.; CALDAS, R.G. Carbon and soil microbial respiration in soil from conventional, organic vineyards and comparison with an adjacent forest. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n.2, p. 437-448, 2012.

ANANYEVA, N.D.; ROGOVAYA, S.V.; IVASHCHENKO, K.V.; VASENEV, V.I.; SARZHANOV, D.A.; RYZHKOV, O.V.; KUDEYAROV, V.N. Carbon dioxide emission and soil microbial respiration activity of Chernozems under anthropogenic transformation of terrestrial ecosystems. **Eurasian Journal Soil Science**, Samsun, v.5, n.2, p.146 – 154, 2016.

ANDERSON, J. P. E; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 10, p. 215-221, 1978.

ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in dormant state. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 81-89, 1985.

ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Application of eco-physiological quotients (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, n. 2, p. 251- 255, 1990.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.



ANDERSON, T.H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. **Agriculture Ecosystems Environmental**, Amsterdam, v.98, p.285-293, 2003.

ANDERSON, T.; DOMSCH, K.H. Soil microbial biomass: the eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.42, p.2039-2043, 2010.

ANDRADE, D. S.; MIYAZAWA, M.; HAMAKAWA, P. J. Microrganismos amonificadores e nitrificadores. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R (Eds). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 355-364.

AQUINO, G. S.; MEDINA, C. C.; PORTERA JUNIOR, A. L.; SANTOS, L. O.; CUNHA, A. C. B.; KUSSABA, D. A. O.; SANTOS JUNIOR, J. H.; ALMEIDA, L. F.; SANTIAGO, A. D. Sistema radicular e produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar sob diferentes quantidades de palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, p. 1150-1159, 2015.

APOLARI, J.P. Efeito da aplicação de composto orgânico sobre a qualidade do solo cultivado com cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). 2015. 134 f. **Tese** (Doutorado em Ciências - Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente), Curso de Pós-Graduação em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Microbial biomass and activity in a Brazilian soil plus untreated and composted textile sludge. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1043-1046, 2006.

ARAÚJO, A.S.F.; LEITE, L.F.C.; IWATA, B.F.; LYRA JÚNIOR, M.A.; XAVIER, G.R; FIGUEIREDO, M.V.B. Microbiological process in agroforestry system: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v.32, p.215–226, 2012.

ASCHER, J., CECCHERINI, M.T., CHRONÁKOVA, A., JIROUT, J., BORGOGNI, F., ELHOTTOVA, D., SIMEK, M., PIETRAMELLARA, G. World evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) - apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.26, p. 1721–1726, 2010.

ASSIS, E.P.M.; CORDEIRO, M.A.S.; PAULINO, H.B.; CARNEIRO, M.A.C. Efeito da aplicação de nitrogênio na atividade microbiana e na decomposição da palhada de sorgo em solo de cerrado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 2, p. 107-112, 2003.

AZAR, G.S.; ARAÚJO, A.S.F.; OLIVEIRA, M.E.de.; AZEVÊDO, D.M.M.R. Biomassa e atividade microbiana do solo sob pastagem em sistemas de monocultura e silvipastoril. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n.6, p. 2727-2736, 2013.

AZEVEDO, L.C.B.; MORAIS, M.; LAMBAIS, M.R. Early changes in soil metabolic diversity and bacterial community structure in sugarcane under two harvest management systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.39, p.701-713, 2015.

BAILEY, V.L.; PEACOCK, A.D.; SMITH, J.L.; BOLTON, H. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p.1385–1389, 2002.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, n.1, p.641-649, 1998.

BARRETO, P.A.B.; GAMA-RODRIGUES, E.F. DA; GAMA-RODRIGUES, A.C. DA; BARROS, N.F. DE; FONSECA, S. Atividade microbiana, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em plantações de eucalipto, em seqüência de idades. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p.611-619, 2008.

BARROS, Y.J.; MELO, V.F.; DIONÍSIO, J.A.; OLIVEIRA, E.B.; CARON, L.; KUMMER, L.; AZEVEDO, J.C.R.; SOUZA, L.C.P. Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo. I – microrganismos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.1397-1411, 2010.

BATISTA, S. B. Diversidade e atividades microbianas do solo da Floresta Amazônica - Brasil, submetida a estresse hídrico utilizando técnicas de biologia molecular. 2007. 131 f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia), Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BERNARDES, M.S.; CÂMARA, G.M.S. Cultura da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Produção Vegetal, 2001. 20 p.

BORGES, L. A. B.; RAMOS, M. L. G.; VIVALDI, L. J.; FERNANDES, P.M.; MADARI, B. E.; SOARES, R.A.B.; FONTOURA, P. R. Impact of sugarcane cultivation on the biological attributes of an oxisol in the brazilian Savannah. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n.5, p. 1459-1453, 2014.

BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 704p.

BRAGA, R.R.; SILVA, D.V.; FERREIRA, E.A.; PEREIRA, G.A.M.; BIBIANO, C.S.; SANTOS, J. B.; DIAMANTINA, S.S.; MATOS, C.C. Atividade microbiana do solo, controle de plantas daninhas e crescimento da mandioca após a aplicação de herbicidas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n.4, p. 1050-1058, 2014.

BROCKETT, B. F. T.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.44, p.9–20, 2012.

BRONS, J.K.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.74, p.2717–2727, 2008.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 269-279, 1995.

BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure

microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 17, p. 837–842, 1985.

BUSTAMANTE, M.M.C.; MEDINA, E.; ASNER, G.P.; NARDOTO, G.B.; GARCIA-MONTIEL, D.C. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. **Biogeochemistry**, Corvallis, v.79, p.209-237, 2006.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2009. 77p. (Boletim Técnico, 106, Edição revista e atualizada).

CARMO, D. L.; NANNETTI, D. C.; DIAS JUNIOR, M. S.; LACERDA, T. M.; NANNETTI, A. N.; MANUEL, L. Chemical and physical attributes of a Latosol and coffee crop nutrition in agroforestry and conventional management system. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, p. 122-131, 2014.

CARVALHO, L. A.; MEURER, I.; SILVA JÚNIOR, C. A.; CAVALIERI, K. M. V.; SANTOS, C. F. B. Dependência espacial dos atributos físicos de três classes de solos cultivados com cana-de-açúcar sob colheita mecanizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 9, p. 940–949, 2011.

CARVALHO, L. C.; BUENO, R. C. O de F.; CARVALHO, M. M.; FAVORETO, A. L.; GODOY, A. F. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n. 16, p. 530-543, 2013.

CASIDA, L.E.J; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science Philadelphia**, v.98, p.371-376, 1964.

CENCIANI, K. Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação. 2007. 103f. **Tese** (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Microbiologia Agrícola). Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I.; CARVALHO, P. C. DE F.; E MEURER, E. J. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 10, p. 1254-1261, 2011.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2016). **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Segundo Levantamento, agosto/2016, Brasília: CONAB, 72 p.

CORREIA, K.G.; ARAUJO FILHO, R.N.; MENEZES, R.S.C.; SOUTO, J.S.; FERNANDES, P. D. Atividade microbiana e matéria orgânica leve em áreas de Caatinga de diferentes estágios sucessionais no semiárido paraibano. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 1, p. 196–202, 2015.

COSER, T. R. RAMOS, M. L. G.; AMÁBILE, R. F.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo de Cerrado com aplicação de fertilizante nitrogenado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 399-406, 2007.

COUTO, R.R. Dinâmica do carbono e rendimento de culturas em solo com histórico de aplicação de dejetos suínos e fertilizante nitrogenado mineral. 2010. 107 f.

**Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas). Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

COSTA, C.T.S.; FERREIRA, V.M.; ENDRES, L.; FERREIRA, D.T. da R.G.; GONÇALVES, E.R. Crescimento e produtividade de quatro variedades de cana-de-açúcar no quarto ciclo de cultivo. *Revista Caatinga*, Mossoró, v.24, p.56-63, 2011.

COSTA, D.P.; DIAS, A.C.F.; DURRER, A.; ANDRADE, P.A.M.; GUMIERE, T.; ANDREOTE, F.D. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.38, p.694-1702, 2014.

COSTA, E. M. da; SILVA, H. F.; RIBEIRO, P. R. de A. Matéria orgânica do solo e o seu papel na manutenção e produtividade dos sistemas agrícolas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1842-1860, 2013.

CUNHA, E. D. Q.; STONE, L. F.; FERREIRA, E. P. D. B.; DIDONET, A. D.; MOREIRA, J. A. A.; LEANDRO, W. M. Sistemas de preparo do solo e culturas de cobertura na produção orgânica de feijão e milho: II - atributos biológicos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 603-611, 2011.

DADALTO, J.P.; FERNANDES, H.C.; TEIXEIRA, M.M.; CECON, P.R.; MATOS, A.T. Sistema de preparo do solo e sua influência na atividade microbiana. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.35, n.3, p.506-513, 2015

DALCHIAVON, F.C.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, F.G.; MONTANARI, R.; ANDREOTTI, M. Produtividade da cana-de-açúcar e definição de zonas específicas de manejo do solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2077-2088, 2013.

DELBEM, F. C.; SCABORA, M. H.; SOARES FILHO, C. V.; HEINRICH, R.; CROCIOLLI, C. A., CASSIOLATO, A. M. R. Fontes e doses de adubação nitrogenada na atividade microbiana e fertilidade do solo cultivado com *Brachiaria brizantha*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 361-367, 2011.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos da tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Tecnologia Rural, 1977. 364p.

DIAS, A.C.F. Transformações de nitrogênio nos solos. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (Eds.). **Microbiologia do Solo**. 2ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. cap.7, p. 33-101.

DINIZ, T.; RAMOS, M.L.G.; VIVALDI, L.J.; ALENCAR, C.M. DE; JUNQUEIRA, N.T.V. Alterações microbianas e químicas de um gleissolo sob macaubeiras nativas em função da variação sazonal e espacial. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, p.750-762, 2014.

DUARTE, S.; CÁSSIO, F.; PASCOAL, C. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology — Insights from freshwaters. In: MAGDELDIN, S (Ed.) **Gel electrophoresis — principles and basics**. InTech, Rijeka, Croatia, 2012. p. 173–195.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.9, p.167-172, 1977.

EVANGELISTA, C. R.; PARTELLI, F. L.; FERREIRA, E. P. B.; PIRES, F. R. Atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1549-1562, 2013.

FAHL, J.I.; CAMAERGO, M. B. P. De; PIZZINATTO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M.T.de; DE MARIA, I.C.; FURLANI, A.M.C. (Eds.) Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Campinas: Instituto Agrônomo, 6.ed. 1998. 396p. (**Boletim 200**)

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 991-996, 1999.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, E.P. de. B.; STONE, L. F.; MARTIN-DIDONET, C.C.G. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2017.

FIGUEIREDO, C.C.; RAMOS, M.L.G.; TOSTES, R. Propriedades físicas e matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob sistemas de manejo e cerrado nativo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.24, n.3, 24-30, 2008.

FOSHTOMI, M.Y.; BRAECKMAN, U.; DERYCKE, S.; SAPP, M.; GANSBEKE, D.V.; SABBE, K.; WILLEMS, A.; VINCX. M.; VANAVERBEKE, J. The link between microbial diversity and nitrogen cycling in marine sediments is modulated by macrofaunal bioturbation. **PLoS ONE**, San Francisco, v.23, p.1-20, 2015.

FRANCIOLI, D; ASCHER, J; CECCHERINI, M.T.; PIETRAMELLARA, G. Land use and seasonal effects on a Mediterranean soil bacterial community. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v.14, n.3, p.710-722, 2014.

FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.5, p.579-590, 2010.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; SANTOS, G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.9, p.893-901, 2005.

GAMA-RODRIGUES, S. F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS G. A.; CAMARGO, F.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008.

GONÇALVES, A.S.; MONTEIRO, M.T.; GUERRA, J.G.M.; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana em amostras de solos secadas ao ar e reumedecidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 651-658, 2002. p.159-170.

GOU, X.; TAN, B.; WU, F.; YANG, W.; XU, Z.; LI, Z.; ZHANG, X. Seasonal dynamics of soil microbial biomass C and N along an elevational gradient on the eastern tibetan Plateau, China. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n.7, 2015.

GRAHAM, M. H.; HAYNES, R. J.; ZELLES, L. E.; MEYER, J. H. Longterm effects of green cane harvesting versus burning on the size and diversity of the soil microbial community. **Proceedings of th South African Sugar Technologists Association**, Mount Edgecombe, v.75, p.228-234, 2001.

GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; ANGERS, D.A.; MONREALL, C.M.; ELLERT, B.H. Towards a minimum data set to assess soil organic-matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 74, p. 367-385, 1994.  
HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, p.1-9, 2001. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: mar/2016.

HELUANY, M. H. 2015.74f.Atributos microbiológicos na mudança de uso da terra para produção de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Microbiologia Agrícola), Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

HEUER, H.; WIELAND, G.; SCHÖNFELD, J.; SCHÖNWÄLDER, A.; GOMES, N.C.G.; SMALLA, K. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis of denaturing gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: **Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications**. VAN ELSAS, J.D.; WELLINTON, E.M.H.; TREVORS, J.T. (Eds.). Horizon Scientific Press. Wymondham, UK, 2001. p.77-190.

IRVINE, J.; LAW, B.E. Contrasting soil respiration in young and old-growth ponderosa pine forests. **Global Change Biology**, Oxford, v.8, p.1183–1194, 2008.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 408-416, 1998.

ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. **Agriculture Ecosystem Environmental**, Amsterdam, v.79, p.9-16, 2000.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.8, p.167-177, 1976.

JORIS H.A.W.; SOUZA, T.R.; MONTEZANO, Z.F.; VARGAS, V.P.; CANTARELLA H. Evaluating nitrogen behaviour in sugarcane after fertilization using leaf and sap extract analyzes. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p. 2655-2664, 2014.

KAISER, E.A.; MARTENS, R.; HEINEMEYER, O. Temporal changes in soil microbial biomass carbon in an arable soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.170, p.287-295, 1995.

KARAM, D.S.; JAMIL, M.N.C.; JAAFAR, N.; RAJOO, K.S.; ARIFIN, A. Effects of different incubation periods on microbial biomass carbon (MBC) in two soil series. **Journal of Environmental Science and Pollution Research**, v.1, n.1, p.20-22, 2015.

KENNEDY, A.; DORAN, J. Sustainable agriculture: role of microorganisms. In: BITTON, G. (Org.) **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 2002. p. 3116-3126.



KORASAKI, V.; MORAIS, J. W. de; BRAGA, R. F. Macrofauna. In: MOREIRA, F. M.S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (Eds.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: Editora da UFPA, 2013. p. 79-128.

LA ESCALA JR, N.; MARQUES JR, J.; PEREIRA, J. T.; CORA, J. E. Short-term temporal changes in the spatial variability model of CO<sub>2</sub> emissions from Brazilian bare soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1459-1462, 2000.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4, p.43-84.

LIAO, Q.; WEI, G.P.; CHEN, G.F.; LIU, B.; HUANG, D.L.; LI, Y.R. Effect of trash addition to the soil on microbial communities and physico-chemical properties of soils and growth of sugarcane plants. **Sugar Tech**, Amsterdam, v.16, n.4, p.400–404, 2014.

LIMA, R. P. de; LEÓN, M. J. de; SILVA, A. R. da. Compactação do solo de diferentes classes texturais em áreas de produção de cana-de-açúcar. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 1, p. 16-20, 2013.

LOPES, E. L. N.; FERNANDES, A. R.; RUIVO, M. L. P.; CATTANIO, J. H.; SOUZA, G. F. Microbial biomass and soil chemical properties under different land use systems in northeastern Pará. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, 1127-1139, 2011.

MA, L.; GUO, C.; LÜ, X.; YUAN, S.; WANG, R. Soil moisture and land use are major determinants of soil microbial community composition and biomass at a regional scale in northeastern China. **Biogeosciences**, Gottingen, v.12, p.2585–2596, 2015.

MACHADO, D.M.; SOUZA, T. R. S.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F.R.; PIAULINO, A.C. Atividades microbianas e as transformações no ciclo dos elementos no solo. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n.15, p.180-195, 2012.

MALUCHE-BARETTA, C. R. D ; KLAUBERG FILHO, O.; AMARANTE, C.V.T.; RIBEIRO, G.M.; ALMEIDA, D. Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 655-665, 2007.

MANZONI, S., TAYLOR, P., RICHTER, A., PORPORATO, A., AGREN, G.I. Environmental and stoichiometric controls on microbial carbon-use efficiency in soils. **New Phytologist**, Cambridge v.196, p.79-91, 2012.

MARAFON, A. C.; SANTIAGO, A. D.; SILVA, P. DE A.; IVO, W. M. P. M.; SILVA, E. F. Crescimento e produtividade da cana-de-açúcar com manutenção de palhada em Argissolo dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 37p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 96).

MATOS, M.A. Atributos químicos e microbiológicos do solo após aplicações de resíduos de suínos em sistema de plantio direto. 2006. 91f. **Dissertação** (Mestrado em

Química dos Recursos Naturais). Curso de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JUNIOR, G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, p.295-301, 2001.

MAZURANA, M.; FINK, J.R.; CAMARGO, E.; SCHMITT, C.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F.A.de.O. Estoque de carbono e atividade microbiana em sistema de plantio direto consolidado no sul do Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.36, n.3, p. 288-296, 2013.

MELLO IVO, W. M. P. Dinâmica da matéria orgânica em áreas de produção de cana-de-açúcar colhida crua e queimada, no Nordeste do Brasil. 2012. 144 f. **Tese** (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares - Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente). Curso de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

MENDES, I.; SOUZA, L.; RESCK, D.; GOMES, A. Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 435-443, 2003.

MENDONZA, H.N.S.; LIMA, E.; ANJOS, L.H.C.; SILVA, L.A.; CEDDIA, M.B. & ANTUNES, M.V.M. Propriedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.1, p.201-207, 2000.

MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; BESAN, F.M.; LOVATO, T.; FERNÁNDEZ, F.F. e DEBARBA, L. Manejo de solo e culturas e sua relação com os estoques de carbono e nitrogênio do solo. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.G.; LIMA, J.M.; LOPES, A.S.; ALVAREZ V., V.H. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. v.3, p.209-248.

MOITINHO, M. R.; PADOVAN, M. P.; PANOSSO, A. R.; LA SCALA, N. Efeito do preparo do solo e resíduo da colheita de cana-de-açúcar sobre a emissão de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 6, p. 1720-1728, 2013.

MONQUERO, P.A.; REIS, F.C.; MUNHOZ, W.S.; HIRATA, A.C.S.; MENEGHIN, S.P. Solos cultivados com cana-de-açúcar: persistência e impactos de herbicidas na microbiota do solo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.7, n.3, p. 380-387, 2012.

MONTEIRO, M.T.; GAMA-RODRIGUES, E.F. Carbono, nitrogênio e atividade da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira de uma floresta natural. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.819-826, 2004.

MORAIS, M. Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar. 2008. 88f. **Tese** (Doutorado em Ciências - Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas). Curso de Pós-Graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.



MÜLLER, D.H.; CAMILI, E. C.; GUIMARAES, S. C.; CAMPO, D. T. S.; MARTINS, M. E.; BARROS, K. C. Biomassa e atividade microbiana de solo sob aplicação de resíduos orgânicos. **Revista Internacional de Ciências**, v. 4, n.2, p. 71-82, 2014.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; ULTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.73, n.1, p.127-141, 1998.

NASCIMENTO, P. C; LANI, J. L.; MENDONÇA, E. S.; ZOFFOLI, H. J. O.; PEIXOTO, H. T. M. Teores e características da matéria orgânica dos solos hidromórficos do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, n.2, p.339-3347, 2010.

NICODEMO, M.L.F. **Uso de biomassa microbiana para avaliação de qualidade do solo em sistemas silvipastoris**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. 35 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 93). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/PPPSE-2010/19145/1/PROCIDoc93MLFN2009.00411.pdf>>. Acesso em: 25 ago.2016.

NIELSEN, M.N.; WINDING, A. **Microorganisms as indicators of soil health**. Denmark, National Environmental Research Institute, 2002. 84p. (Technical Report, 388).

NOVA CANA. **A produção de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo)**, Paraná, jun.2016. Seção Tudo sobre. Disponível em:<<https://www.novacana.com/cana/producao-cana-de-acucar-brasil-emundo/>>. Acesso em: 07 jun.2016.

OLIVEIRA, A. K. M.; CARAMORI, S.S. Análise comparativa de hidrolases de solos de cana-de-açúcar, milho e soja no estado de Goiás. **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**, Pirenópolis, v.3, p.1-5, 2016.

OLIVEIRA, A. K. M.; MOREIRA, L. M. O.; ZAGO, L. M. S.; RODRIGUES, D. F.; CARAMORI, S. S. Atividade de proteases presentes em solos de Cerrado com cana-de-açúcar, milho e soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 55., 2015, Goiânia. **Anais...Goiânia: Associação Brasileira de Química**, 2015. p.1-4.

OLIVEIRA, A. P. P de; LIMA, E.; DOS ANJOS, L. H. C.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G. Sistemas de colheita da cana-de-açúcar: Conhecimento atual sobre modificações em atributos de solos de tabuleiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.18, n.9, p.939-947, 2014.

OLIVEIRA, L.; BARROCAS, R. **Vantagens e desvantagens da queimada da cana no estado de São Paulo, Brasil**. In: 8º Encuentro de Geografos de America Latina, 2001, Santiago. 8º Encuentro de Geografos de America Latina, 2001.

OMORI, W.P. Diversidade bacteriana em solos, vinhaça e semicompostagem relacionados ao cultivo de cana-de-açúcar. 2014. 84f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

OVREÃS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p.236-251, 2000.

PAES, J.M.V.; ANDREOLA, F.; BRITO, C.H.; LOUDES, E.G. Decomposição da palha de café em três tipos de solo e sua influência sobre a CTC e o pH. **Revista Ceres**, Viçosa, v.43, p.337-392, 1996.

PAREDES JUNIOR, F. P.; PORTILHO, I. I. R.; CARVALHO, L. A.; MERCANTE, F. M. Atributos microbiológicos em cultivos de cana-de-açúcar sob métodos de preparo do solo. *Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, Belém, v. 57, n.2, p. 101, 2014.

PAREDES JUNIOR, F.P.; PORTILHO, I.I.R; MERCANTE, F.M. Atributos microbiológicos de um latossolo sob cultivo de cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 151-164, 2015.

PARKIN, T.B.; DORAN, J.W.; FRANCO-VIZCAÍNO, E. Field and laboratory tests of soil respiration. In: DORAN, J.W.; JONES, A. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p.231-245.

PEREIRA, J. DE. M.; BARETTA, D.; BINI, D.; VASCONCELLOS, R.L.de.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Relationships between microbial activity and soil physical and chemical properties in native and reforested *Araucaria angustifolia* forests in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 572-586, 2013.

PEREZ, K.S.S.; RAMOS, M.L.G.; McMANUS, C. Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.567-573, 2004.

PEREZ, K.S.S.; RAMOS, M.L.G.; McMANUS, C. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.137-144, 2005.

PIRES, C. A.; RACHID, C. T.; LEITE, D. C. A.; PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L.C.; BALIEIRO, F.C.; SALTON, J.; ZANATTA, J.A. Impacto de diferentes níveis de palhada de cana-de-açúcar sobre comunidade bacteriana total de Latossolo do Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO CIÊNCIA DO SOLO, 33., 2011, Uberlândia. **Anais...Uberlândia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2011. p.1-3.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, p. 1215-1221, 2011.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n.2, p. 159-164, 1987.

PRAGANA, R.B.; NÓBREGA, R.S.A.; RIBEIRO, M.R. & LUSTOSA FILHO, J.F. Atributos biológicos e dinâmica da matéria orgânica em Latossolos Amarelos na região do Cerrado piauiense sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.36, p.851-858, 2012.

PRIMO, D.C.; MENEZES, R.S.C.; SILVA, T.O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v.7. n. 5, p.1-13, 2011.

PUPIN, B.; NAHAS, E. Impact of successive sugarcane harvests and trash management practices on soil microbiological properties. **Soil Research**, Sydney, v.49, n.2, p.183–189, 2011.

PURCENA, L.L. A. 2014. 103 f. Prospecção de enzimas de solo de Cerrado sob cultivo de cana-de-açúcar. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas), Curso de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

PURCENA, L.L. A.; DI MEDEIROS, M.C.B.; LEANDRO, W.M.; FERNANDES, K. F. Effects of organic and conventional management of sugarcane crop on soil physicochemical characteristics and phosphomonoesterase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, p. 1456-1463, 2014.

RACHID, C.T.C.C.; PIRES, C.A.; LEITE, D.C.A.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SALTON, J.; ZANATTA, J.A.; MERCANTE, F.M.; ANGELINI, G.A.R.; BALIEIRO, F.C. Sugarcane trash levels in soil affects the fungi but not bacteria in a short-term field experiment. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.47, p.322-326, 2016.

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L, PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; RAQUEL S. PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **Plos One**, San Francisco, v.8, n.3, p.1-8, 2013.

RACHID, C.T.C.C.; PICCOLO, M.C.; LEITE, D.C.A.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; VAN ELSAS, J.D.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems. **Biomed Central Microbiology**, Oxford, v. 12, p.2-11, 2012.

RAIJ, B.VAN.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285p.

RALTE, V.; PANDEY, H.N.; BARIK, S.K.; TRIPATHI, R.S.; PRABHU, S.D.Changes in microbial biomass and activity in relation to shifting cultivation and horticultural practices in subtropical evergreen forest ecosystem of north-east India. **Acta Oecologica**, Montrouge, v.28, n.2, p. 163-172, 2005.

RAMOS, M.L.G.; CARVALHO, J.G.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; FERRAZ, D.M.M.; CARVALHO, A.M. de; AMÁBILE, R.F. Efeitos de doses de nitrogênio via fertirrigação na dinâmica microbiana, em solo cultivado com trigo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, p.376-383, 2010.

ROBERTSON, F. A.; THORBURN, P. J. Management of sugarcane harvest residues: consequences for soil carbon and nitrogen. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.45, p.13-23, 2007.

ROS, P.B. Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli subsp. xyli*. 2004. 58f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Curso

de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

RUEHR, N.K.; KNOHL, A.; BUCHMANN, N. Environmental variables controlling soil respiration on diurnal, seasonal and annual time-scales in a mixed mountain forest in Switzerland. **Biogeochemistry**, Corvallis, v.98, p.153–170, 2010.

RUPPEL, S.; TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; ØVREÅS, L.; RÜHLMANN, J. Nitrogen availability decreases prokaryotic diversity in sandy soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.43, n.4, p.449–459, 2007.

SANTOS, V.B. dos; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; PAULETTO, E.A.; GOMES, A. da S.; SILVA, D.G. da. Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e nitrogênio totais de um Planossolo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, p.333-338, 2004.

SANTOS, V. M.; MAIA, L. C. Bioindicadores de qualidade do solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 10, p. 195-223, 2013.

SARATHCHANDRA, U. Nitrification activities and the changes in the populations of nitrifying bacteria in soil perfused at two different H-ion concentrations. **Plant and Soil**, The Hague, v.50, n.1, p.99-111, 1978.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. de. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. de A. (Eds.). **Canadá-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. 882p.

SCHMIDT, E.L.; BELSER, L.W. Nitrifying bacteria. In: PAGE, A.L. **Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties**, n. 9. ed. 2. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 1027-1042.

SCHMIDT, R. O.; SANA, R. S.; LEAL, F. K.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; MEURER, E. J. Biomassa e atividade microbiana do solo em sistemas de produção olerícola orgânica e convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 270-276, 2013.

SCHLESINGER, W.H.; ANDREWS, J.A. Soil respiration and the global carbon cycle. **Biogeochemistry**, Corvallis, v.48, n.1, 7–20, 2000.

SILVA F.A.S.; AZEVEDO C.A.V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agriculture Research**, Nigéria, v.11, n.39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, A.O.; SILVA, W.M; KURIHARA, C.H.; MERCANTE, F.M. Spectrophotometric method for quantification of soil microbial biomass carbon. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 15, p. 565-570, 2016.

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; SILVEIRA, A.O.; SILVA, D. A. A.; RASCHE, M. M.; PASSOS, V. H. G.; SILVA, B. R. Indicadores microbiológicos de solo em pastagem com aplicação sucessiva de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 1585-1594, 2015.

SILVA, J.E.; RESCK, D.V.S. Matéria orgânica do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p.467- 524.

SILVA, K. S.; RIBEIRO, E. S.; SOUZA, R. S.; CHAVES, A. G. S.; WEBER, O. L. S. Alterações das propriedades químicas de um solo reflorestado com *Tectona grandis* L.f. na região de Nova Maringá, MT. **Revista Eletrônica Geoaraguaia**, Barra do Garças, Edição Especial, p.163-178, 2013.

SIX, J.; FREY, S.D.; THIES, R.K.; BATTEN, K.M. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.70, p.555-569, 2006.

SMALLA, K.; OROS-SICHLER, M.; MILLING, A.; HEUER, H.; BAUMGARTE, S.; BECKER, R.; NEUBER, G.; KROPF, S.; ULRICH, A.; TEBBE, C.C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.69, p.470-479, 2007.

SMITH, J. L. Cycling of nitrogen through microbial activity. p. 91-120. In HATFIELD, J.L.; STEWART, B. A. (Ed). **Soil Biology: effects on soil quality**. CRC Press, Boca Raton, 1994. 317 p.

SOUZA, F.A.; SILVA, E.B.; CAMPOS, A.T.; GANDINI, A.M.M.; CORRÊA, J.M.; GRAZZIOTTI, P.H. Atividade microbiana e produção da lavoura cafeeira após adubação com dejetos líquidos de suínos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, n.4, v.30, p. 1041-1049, 2014.

SOUZA, R.F.de.; BRASIL, E.P.F.; FIGUEIREDO, C.C.de.; LEANDRO, W.M. Soil microbial biomass and activity in wetlands located in preserved and disturbed environments in the cerrado biome. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n.4, p. 1049-1061, 2015.

SOUZA, R. A.; TELLES, T. S.; MACHADO, W. S.; HUNGRIA, M.; TAVARES FILHO, J.; GUIMARAES, M. F. Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 155, n.1, p. 1-6, 2012.

SOUZA, R.C.; MENDES, I.C.; REIS-JUNIOR, F.B.; CARVALHO, F.M.; NOGUEIRA, M.A.; VASCONCELOS, A.T.R.; VICENTE, V.A.; HUNGRIA, M. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado? **Biomed Central Microbiology**, Oxford, v. 16, n.42, p. 1-15, 2016.

SOUZA, Z.M.; PRADO, R.M.; PAIXÃO, A.C.S.; CESARIN, L.G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.271-278, 2005.

SPOHN, M.; CHODAK, M. Microbial respiration per unit biomass increases with carbon-to-nutrient ratios in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.81, p. 128–133, 2015.

TAN, X.; CHANG, S.X.; KABZEMS, R. Soil compaction and forest floor removal reduced microbial biomass and enzyme activities in a boreal aspen forest soil. **Biology Fertility of Soils**, Berlin, v.44, p.471–479, 2008.

TAVARES, R. L. M.; FARHATE, C. V. V.; SOUZA, Z. M.; LA SCALA, N.; TORRES, J. L. R.; CAMPOS, M. C. C. Emission of CO<sub>2</sub> and soil microbial activity in sugarcane management systems. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 10, n. 9, p. 975–982, 2015.

- TER BRAAK, C. J.F.; SMILAUER, P. CANOCO reference manual and CanocoDraw for Windows user's guide: **Software for canonical community ordination (Version 4.5)**. Microcomputer power Ithaca, New York, 2002.
- TORSVIK, V., DAAE, E. L., SANDAA, R.A., e ØVREAS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.64, p. 53-62, 1998.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in microbiology**, New York, v.5, n.3, p.240-245, 2002.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.
- TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Eds). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p.195-276.
- VALIM, W. C.; PANACHUKI, E.; PAVEI, D. S.; ALVES SOBRINHO, T.; ALMEIDA, W.S. Effect of sugarcane plant residues in control interrill erosion. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 5, p. 57-69, 2016.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.
- VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.E.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.32, p.133-154, 1998.
- VARGAS, L. K.; SELBACH, P. B.; SÁ, E, L, S. Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.749-755, 2004.
- VARGAS, V.P. Gases de efeito estufa de solos cultivados com cana-de-açúcar: manejo do nitrogênio e da palhada. 2014a. 239f. **Tese** (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós-Graduação – IAC.
- VARGAS, V.P.; CANTARELLA, H.; MARTINS, A.A.; SOARES, J.R.; CARMO, J.B.; ANDRADE, C.A. Sugarcane crop residue increases N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions under high soil moisture conditions. **Sugar Tech**, Amsterdam, v.16, n.2, p.174–179, 2014b.
- WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.13, p.1627-1637, 1998.
- WARDLE, D. A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. cap. 21, p. 419-436.
- WARDLE, D.A. Changes in the microbial biomass and metabolic quotient during leaf litter succession in some New Zealand forest and scrubland ecosystems. **Functional Ecology**, London, v. 7, n. 3, p. 346-355, 1993.

YU, X.; ZHA, T.; PANG, Z.; WU, B.; WANG, X.; CHEN, G.; LI, C.; CAO, J.; JIA, G.; LI, X.; WU, H. Response of Soil Respiration to Soil Temperature and Moisture in a 50-Year-Old Oriental Arborvitae Plantation in China. **Plos One**, San Francisco, v.6, n.12, 2011.

ZAMAN, M.; CAMERON, K.C.; DI, H.J.; INUBUSHI, K. Changes in mineral N, microbial biomass and enzyme activities in different soil depths after surface applications of dairy shed effluent and chemical fertilizer. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.63, p.275-290, 2002.

ZHA, T.S.; NIINISTO, S.; XING, Z.; WANG K-Y.; KELLOMAKI, S. Total and component carbon fluxes of a Scots pine ecosystem from chamber measurements and eddy covariance. **Annual Botany**, Oxford, v.99, p.345–353, 2007.

ZHANG, C.; LIU, G.; XUE, S.; SONG, Z. Rhizosphere soil microbial activity under different vegetation types on the Loess Plateau, China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 161, p. 115-125, 2011.

**ANEXOS**



## ANEXO A – SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PARA DILUIÇÕES

Composto químico	Concentração da solução estoque (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Solução (mL da solução estoque L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2M)	3,48	4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2M)	2,72	1,0

Fonte: Retirado de Andrade et al. (1994).

**ANEXO B – MEIO DE CULTURA PARA AMONIFICADORES (SARATHCHANDRA, 1978)**

Composto	Quantidade
Ácido casamino (arceína ou caseína hidrolisada)	10,0 g
Extrato de levedura	0,1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01 g
Fenol vermelho	0,02 g
Água destilada ou deionizada	1 L

Fonte: Retirado de Andrade et al. (1994).

**ANEXO C – MEIO DE CULTURA PARA NITRIFICADORES (SCHMIDT E BELSER, 1982)**

Composto químico	Concentração da solução estoque (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Meio de cultivo (mL da solução estoque L <sup>-1</sup> )	
		Oxidantes do amônio	Oxidantes do nitrito
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,00	10,0	
KNO <sub>2</sub>	0,85		1,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,34	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,00	1,0	5,0
Azul de bromotimol	0,04	5,0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2M)	3,48		4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2M)	2,72	7,5	1,0
Ferro quelato		1,0	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,246		
EDTA dissódico	0,331		
Micronutrientes		1,0	1,0
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,010		
MnCl <sub>2</sub>	0,020		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0002		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,010		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,002		

Fonte: Retirado de Andrade et al. (1994).