**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Atributos microbiológicos de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.)

Cátia Aparecida Simon

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2021**

Cátia Aparecida Simon
Licenciada em Ciências Biológicas

Atributos microbiológicos de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Simon, Cátia Aparecida

Atributos microbiológicos de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.) / Cátia Aparecida Simon. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011- - - Piracicaba, 2021.

121 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mapeamento biológico 2. Plantas de cobertura 3. Manejo do solo 4. Defensivos I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, senhor João Carlos Simon e a senhora Neuza Maria da Silva Simon, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho e apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos e por colocar boas pessoas no meu caminho.

Aos meus pais, a senhora Neuza Maria da Silva Simon e o senhor João Carlos Simon, pelo incentivo na realização do curso de doutorado, principalmente a minha mãe por ter acreditado mais em mim do que eu mesma.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela atenção, paciência e apoio durante o processo de definição e orientação. Professor, com você aprendi a olhar para os defeitos dos nossos colegas com mais tolerância, consegui diminuir meu nível de ansiedade e compreendi que não podemos ser escravos do trabalho. Obrigada de coração, hoje vejo o quanto isso faz diferença na vida pessoal e profissional.

Ao grupo DaTerra Coffee, representados pela Isabela Pascoal Becker e seus familiares. É com imensa satisfação que defendo essa tese sabendo que o grupo DaTerra sempre esteve comprometido com atividade de ensino e pesquisa, abrindo as portas da propriedade e assumindo o compromisso para com a área acadêmica. Em especial, agradeço ao Leo (*in memoriam*), que nos deixou marcados pela sua competência, experiência e fascinação pela cafeicultura e pela ciência.

Ao Prof. Dr. Sebastião Ferreira de Lima, que nos anos de convivência durante o mestrado e no período do curso de doutorado sempre esteve presente e muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual, profissional e pessoal.

A minha amiga Marianna Carde Peccinelli pelo companheirismo, pela parceria, pela alegria e simpatia compartilhada. O que seria de mim sem você na ESALQ/USP?

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo, em especial a Denise de Lourdes Colombo Mescolotti, Sonia Pires Moraes e ao Luiz Fernando Baldesin pelo carinho, companheirismo e confiança!

Às minhas irmãs Carla da Penha Simon e Camila da Conceição Simon!

Às amigas construídas dentro da Pós-Graduação, em especial ao Guilherme Nacata, Thaís Nascimento Pessoa, Antonio Marcos Miranda, Yasmin Florentino, Julia Capozzi Franke e Gilmar Martinelli Junior.

Aos meus amigos e amigas das turmas da graduação da ESALQ, tenho imenso orgulho de ter conhecido vocês durante a monitoria da disciplina de Biologia do Solo nos anos de 2017, 2018 e 2019. São tantos amigos, que será difícil nomear um por um sem esquecer de alguém. Sintam-se queridos por mim!

Às amizades construídas dentro do Departamento de Solos, já sinto saudades do café da tarde, das risadas bobas, das festas e das conversas dentro do departamento. Sintam-se todos queridos!

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro concedido com o financiamento dos estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da -Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“Eu carrego comigo uma caixa mágica onde eu guardo meus tesouros mais bonitos, guardo tudo aquilo que aprendi com a vida, tudo o que eu ganhei com o tempo e que vento nenhum leva. O pouco é muito pra mim. O simples é tudo que cabe nos meus dias. Eu vivo de muitas saudades. E quem se arrebenta de tanto existir, vive pra esbanjar sorrisos e flashes de eternidade.”

Caio Fernando Abreu

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Coffee arabica no Brasil	17
2.2 Aplicação de agrotóxicos via solo	18
2.3 A comunidade microbiana no solo	21
2.4 O efeito do manejo agrícola na composição da comunidade microbiana do solo	22
2.5 Manejo do solo com plantas de cobertura	24
2.6 Métodos de estudo das comunidades microbianas	25
2.7 Atividade de enzimas do solo	26 27
2.8 Sequenciamento da Nova Geração (NGS)	30
3. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM DIFERENTES CLASSES DE SOLO COM IMPLANTAÇÃO DE CAFÉ E CULTIVO DE MILHETO	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41 42
3.2.1 Caracterização da área.....	42
3.2.2 Coleta de solos	43
3.2.4 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores	46 45
3.2.5 Extração de DNA dos solos	46
3.2.6 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	47
3.2.7 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)	48
3.2.8 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos	49
3.3 RESULTADOS	50 51
3.3.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores	51
3.3.2 Avaliação de abundância microbiana.....	55
3.3.3 Avaliação da estrutura da comunidade por TRFLP	57
3.3.4 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos	63
3.4 DISCUSSÃO	68
3.4.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores	68
3.4.2 Avaliação de abundância microbiana.....	71
3.4.3 Avaliação da estrutura da comunidade por TRFLP	72

3.4.4 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos.....	73
3.5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
4 EFEITO DO CULTIVO DE COBERTURAS VEGETAIS NA ATIVIDADE E A DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	80 89
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	80
4.1 INTRODUÇÃO.....	81
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.2.1 Caracterização da área.....	83
4.2.2 Coleta e caracterização química dos solos.....	84
4.2.3 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	85
4.2.4 Extração de DNA dos solos.....	85
4.2.5 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	86 86
4.3 RESULTADOS.....	87
4.3.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	87
4.3.2 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	89
4.4 DISCUSSÃO.....	91
4.4.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	91
4.4.2 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	94
4.5 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	95 96
5 INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE DEFENSIVOS QUÍMICOS EMPREGADOS NO CULTIVO DO CAFÉ SOBRE A DIVERSIDADE E A ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	99
5.1 INTRODUÇÃO.....	100
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
5.2.1 Caracterização experimental.....	101
5.2.2 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	103
5.2.3 Extração de DNA dos solos.....	103
5.2.4 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	103
5.2.5 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	104
5.3 RESULTADOS.....	107

5.3.1	Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	107
5.3.2	Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	110
5.3.3	Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	111
5.4	DISCUSSÃO.....	114
5.4.1	Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores.....	114
5.4.2	Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	115
5.4.3	Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP).....	116
5.5	CONCLUSÃO.....	116 117
	REFERÊNCIAS	117
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121

RESUMO

Atributos microbiológicos de solos cultivados com café (*Coffea arabica* L.)

Práticas de manejo como a substituição de uma vegetação natural pelo cultivo agrícola e o plantio de plantas de cobertura nas entrelinhas de cultivos do cafeeiro podem ocasionar mudanças nos processos biológicos do solo, que ainda precisam de estudos. Desta maneira, esta pesquisa objetivou avaliar o comportamento das comunidades de bactérias e fungos, além da atividade enzimática de solos cultivados e manejados para cultivo de café arábica. O trabalho foi conduzido em duas áreas experimentais distintas em Patrocínio/MG e complementados por estudos em microcosmos, sob condições de laboratório. Na área experimental, os estudos foram separados em duas frentes: i) a descrição da resposta das comunidades microbianas do solo frente a implantação de uma nova área de cultivo de café em diferentes classes de solo; e, ii) o efeito do cultivo das entrelinhas com diferentes espécies de plantas de cobertura a estrutura e a atividade biológica do solo. Foram realizadas coletas de solos na profundidade de 0,00 a 0,10 m em diferentes tempos. Os parâmetros avaliados foram: atividade enzimática da β -glucosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase, atributos químicos, granulometria e reação da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), análise de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP) e sequenciamento de DNA. O estudo de microcosmos teve foco no efeito dos defensivos mais utilizados no cultivo do café sobre a fração viva do solo. Nesta etapa, as análises realizadas foram a avaliação da atividade enzimática da arilsulfatase, da fosfatase ácida e da β -glucosidase em três aplicações de defensivos ao longo do tempo, qPCR e T-RFLP do gene bacteriano (*rrs* 16S rRNA). Os resultados indicam que a comunidade microbiana dos solos é modulada pelo seu manejo e suas propriedades. A atividade enzimática dos solos é influenciada por uma série de fatores como as classes de solos e os teores de matéria orgânica, instalação de cultivos e manejo do solo, sendo que os bioindicadores detectam com maior sensibilidade as mudanças de manejo. A ação dos defensivos químicos aplicados sobre o solo indicam que a atividade enzimática e a estrutura da comunidade bacteriana apresenta diferentes respostas ao longo do tempo. Estes dados podem dar base ao desenvolvimento de um manejo mais adequado das áreas cultivadas com café arábica, explorando melhor a biologia destes solos.

Palavras-chave: Mapeamento biológico, Plantas de cobertura, Manejo do solo, Defensivos

ABSTRACT

Microbiological attributes of soil cultivated with coffee (*Coffea arabica* L.)

Management practices such as the replacement of natural vegetation by agricultural cultivation and the planting of cover crops between the rows of coffee crops can lead to changes in the biological processes of the soil, which still need to be studied. Thus, this research aimed to evaluate the behavior of bacterial and fungal communities, in addition to the enzymatic activity of soils cultivated and managed for the cultivation of Arabica coffee. The work was carried out in two distinct experimental areas in Patrocínio/MG and complemented by studies in microcosms, under laboratory conditions. In the experimental area, the studies were separated into two fronts: i) the description of the response of microbial communities in the soil to the implantation of a new area for coffee cultivation in different classes of soil; and, ii) the effect of the cultivation between rows with different species of cover crops on the structure and biological activity of the soil. Soil samples were taken at a depth of 0.00 to 0.10 m at different times. The parameters evaluated were: enzymatic activity of β -glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase, chemical attributes, particle size and real-time polymerase chain reaction (qPCR), analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and DNA sequencing. The microcosm study focused on the effect of pesticides most used in coffee cultivation on the living fraction of the soil. At this stage, the analyzes performed were the evaluation of the enzymatic activity of arylsulfatase, acid phosphatase and β -glucosidase in three pesticide applications over time, qPCR and T-RFLP of the bacterial gene (rrs 16S rRNA). The results indicate that the microbial community in soils is modulated by its management and properties. The enzymatic activity of soils is influenced by a series of factors such as soil classes and organic matter content, installation of crops and soil management, and bioindicators detect management changes with greater sensitivity. The action of chemical pesticides applied to the soil indicate that the enzymatic activity and the structure of the bacterial community present different responses over time. These data can support the development of a more adequate management of the areas cultivated with Arabica coffee, better exploring the biology of these soils.

Keywords: Biological mapping, Cover plants, Soil management, Pesticides

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil o cafeeiro arábica apresentou para a safra 2020/2021 um redução em produção por causa da bienalidade negativa, entretanto houve um aumento para áreas em formação (CONAB, 2021), o Brasil é considerado um dos maiores produtores de café arábica (*Coffea arabica* L.) do mundo, sendo o Estado de Minas Gerais o principal produtor desta cultura. Pode-se dizer que a superioridade de produtividade de café para esta região é alcançada graças as condições climáticas adequadas, ao desenvolvimento de práticas fitossanitárias, nutricionais, e principalmente a adequação as práticas de manejo que visam a capacidade de manter a produtividade de modo sustentável.

Estima-se que o café arábica representa 68% da produção total (arábica e conilon) do país, com uma previsão de 33.365 mil sacas colhidas, apesar de ser um número grande, os dados ainda indica redução de 31,5% quando comparado a safra anterior (CONAB, 2021). Desta maneira, torna-se necessário enfatizar que a substituição de um cultivo por outro pode refletir na modificação de características do solo, como por exemplo o que ocorre na conversão de ecossistemas naturais para áreas cultivadas, o que promove alteração nas taxas de adição e perdas efetivas de matéria orgânica do solo (SOUZA NUNES et al., 2011). Dentro deste componente, sabe-se que a comunidade microbiana do solo pode responder mais rapidamente as mudanças e efeitos provocados pelas alterações no sistema solo do que o conteúdo geral de matéria orgânica do solo.

Em termo gerais a estrutura e o funcionamento das comunidades microbianas do solo são influenciados por uma série de fatores, dentre eles o mais importante é a qualidade dos substratos orgânicos disponíveis (WARDLE, GILLER, 1996). A qualidade indica a composição bioquímica do substrato e a disponibilidade física desses componentes para os microrganismos degradantes, sendo estes afetados pelo manejo agrícola e cobertura vegetal (SWIFT et al., 1979; LUPWAYI et al., 1998 , BENDING et al., 2000).

Em áreas já cultivas com o cafeeiro arábica, a adoção de um manejo mais sustentável do solo vêm sendo introduzida por meio da semeadura de plantas de cobertura nas entrelinhas do cafeeiro. Esta prática de manejo promove diversas melhorias ao sistema, promovendo a diversidade e a estabilidade do sistema solo, em decorrência da melhor utilização dos recursos disponíveis, como água, nutrientes e luz (CORREIA; DURIGAN, 2008). Entretanto, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que descrevem a avaliação dos atributos biológicos de cafeeiro em consórcio com plantas de cobertura.

Outro ponto importante do sistema de cultivo de café que pode atuar na microbiologia do solo trata da aplicação de defensivos químicos utilizados no cafeeiro, propiciando o controle de plantas invasoras, pragas e doenças. A aplicação destas moléculas via solo pode causar efeitos adversos sob a comunidade microbiana do solo, uma vez que quando aplicados o contato é promovido entre os microrganismos e suas moléculas químicas, as quais podem ser utilizadas como fonte de energia, por meio do processo de degradação dos defensivos (DURKIN, 2003), ou podem resultar na perda de viabilidade de grupos microbianos sensíveis a estas. Uma terceira possibilidade de interação entre estes fatores, está na alteração do processo de competição microbiana no solo, o que pode resultar numa estrutura modificada das comunidades microbianas. Para Bohm et al. (2011), a aplicação isolada ou sequencial de glifosato levou a um aumento na atividade microbiana, na taxa de respiração basal e no quociente metabólico do solo. Já para Sampaio et al. (2010), a aplicação de paclobutrazol ocasionou a diminuição da biomassa microbiana do solo. Fato é que existem poucos estudos dentro deste tema, o que pode embasar uma melhoria grande no manejo em relação ao melhor aproveitamento da microbiologia do solo.

Pode-se dizer que a integração dos atributos químicos, físicos e biológicos refletem o estado atual do solo, podendo estes serem utilizados como indicadores de sua qualidade, sendo úteis para tomadas de decisões sobre o sistema de manejo e uso do solo (FREITAS et al., 2012). Recentemente, métodos moleculares, também chamados de independentes de cultivo, têm sido utilizados no estudo da ecologia microbiana por permitir a comparação rápida e eficiente das estruturas das comunidades microbianas presentes em amostras de solos (CAFFARO-FILHO et al., 2007).

Nesse sentido, a caracterização e a correlação entre os atributos biológicos, químicos e físicos de um solo em substituição de cultivo, de uma área consorciada com diferentes plantas de cobertura e manejada com diferentes defensivos no cultivo do cafeeiro, pode ser uma alternativa promissora para sugerir e suportar o desenvolvimento de um manejo do solo mais sustentável para seu cultivo. Desta maneira, este trabalho busca aumentar o conhecimento sobre esta área, conectando diferentes componentes do manejo da cafeicultura com aspectos de atividade e estruturação biológica dos solos.

REFERÊNCIAS

- BENDING, G.D.; PUTLAND, C.; RAYNS, F. Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 78-84, 2000.
- BOHM, G. M. B.; SCHENEIDER, L.; CASTILHOS, D.; AGOSTINETTO, D; ROMBALDI, C. V. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 919-930, 2011.
- CAFFARO-FILHO, R. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L. R. Quantitative analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.736-738, 2007.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de café, segundo levantamento da safra brasileira. **Conab**, v.1, p.1-63, 2021.
- CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. culturas de cobertura e sua influência na fertilidade do solo sob sistema de plantio direto (SPD). **Bioscience Journal**, v.24, p.20-31, 2008.
- DURKIN, P. **Glyphosate - human health and ecological risk assessment**. Forest Service, 2003, 62 p.
- FREITAS, D. A. F DE; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; CURI, N. Índices de qualidade do solo sob diferentes sistemas de uso e manejo florestal e cerrado nativo adjacente. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, p.417-428, 2012.
- LUPWAYI, N.Z.; RICE, W.A.; Clayton, G.W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop sequence. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1733-1741, 1998.
- SAMPAIO, D. B.; SANTOS, V. B. DOS; ARAÚJO, A. S. F. DE. Doses de paclobutrazol sobre a biomassa microbiana do solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, p.1349-1354, 2010.
- SOUZA NUNES, R. DE; CASTRO LOPES, A. A. DE; SOUSA, D. M. G. DE; CARVALHO MENDES, I. DE. Sistemas de manejo e os estoques de carbono e nitrogênio em latossolo de cerrado com a sucessão soja-milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1407-1419, 2011.
- SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. Decomposition in Terrestrial Ecosystems. **Studies in Ecology**, v. 5, 1979, 372 p.
- WARDLE, D.A.; GILLER, K.E. The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p.1549-1554, 1996.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Coffea arabica* no Brasil

No Brasil, o café é um dos produtos agrícolas de maior relevância no comércio internacional, sendo o país o maior produtor mundial. Em abril de 2021, o Brasil exportou 3,3 milhões de sacas de café de 60 kg, quando comparado ao mesmo período do ano de 2020 houve uma queda de 8,5% (CECAFÉ, 2021).

Para o terceiro levantamento de safra/2020 da Conab, o Brasil produzirá 61,62 milhões de sacas beneficiadas de café, sendo que o café arábica representa 77% da produção total no país. Em um ano de bienalidade positiva, estima-se que sejam colhidas 47,3 milhões de sacas de café arábica, indicando aumento de aumento de 38,1%, quando comparada à safra anterior (CONAB, 2020).

No país, a área plantada com café arábica em 2020 foi equivalente a 1,76 milhões de hectares, sendo que o estado de Minas Gerais concentra a maior área cultivada com a espécie, sendo está representada por 1,03 milhões de hectares (CONAB, 2020).

A produção de café arábica na região do Cerrado brasileiro concentra-se no Estado de Minas Gerais, particularmente nas regiões do Alto Paranaíba, do Noroeste e do Triângulo Mineiro, onde estima-se uma produção de 5.929,2 mil sacas de café beneficiadas, representando incremento de 29,1% em relação a 2019 (CONAB, 2020).

O café ocupa posição de destaque entre as bebidas mais consumidas pelos brasileiros, representando um mercado potencialmente grande (ARRUDA et al., 2009). A cafeicultura desenvolvida no cerrado brasileiro é uma das mais desenvolvidas mundialmente quanto a tecnologia, possibilitando explorar o clima favorável, a mecanização, a irrigação e as efetivas práticas fitossanitárias, culturais e nutricionais, as quais em conjunto promovem altas produtividades e excelente qualidade do grão de café (FERNANDES et al., 2012).

No campo acadêmico, o café arábica vêm sendo muito estudado, como por exemplo, em estudos relacionados a identificação de marcadores moleculares ligados à resistência do cafeeiro (*Coffea arabica*) à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (ALVARENGA et al., 2011), estudos sobre o desempenho produtivo e econômico do consórcio de cafeeiro arábica e nogueira-macadâmia, em condições de sequeiro e irrigado por gotejamento, bem como a viabilidade financeira dos tratamentos em diferentes cenários de preço de café (PERDONÁ et al., 2015).

Pode-se encontrar na literatura diferentes trabalhos relacionados a micorrização (FONSECA, 2019; ALBÁN; GUERRERO; TORO, 2013), a composição da matéria orgânica

e fertilidade do solo (MACHADO et. al., 2014; PREZOTTI; ROCHA, 2004) ao crescimento e desenvolvimento de mudas (TATAGIBA; PEZZOPANE; REIS, 2010) e a vários outros temas importantes para a agricultura do cafeeiro arábica no Brasil. Entretanto, ainda são poucos estudos relacionados a avaliações da composição, estrutura, comportamento e atividade da comunidade microbiana de solos cultivados com café arábica.

Na literatura podemos encontrar diferentes estudos que relacionam diferentes manejos do solo no cultivo do cafeeiro arábica e sua influencia nas propriedades microbiológicas do solo principalmente em estudos da avaliação da atividade enzimática e de carbono da biomassa microbiana (AZEVEDO JÚNIOR et al., 2017; RODRIGUES et al., 2022). Como por exemplo Lammel et al. (2015), avaliando atributos biológicos e atividade enzimática em diferentes sistemas de manejo de solo no cultivo de café arábica (convencional, orgânico e consorciado com *Urochloa decumbens* e *Arachis pintoi*) no sul de Minas Gerais. Estes autores descrevem que o carbono orgânico total é o atributo do solo mais influenciado pelos diferentes sistemas de manejo do café e que este influenciou os demais atributos avaliados (atividade enzimática da arilsulfatase, urease e fosfatase, colonização micorrízica e densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana e a taxa de respiração basal do solo). Pouco se conhece sobre as comunidades microbianas dos solos cultivados sob diferentes manejos do café arábica.

Insuficientes são os estudos que utilizam os parâmetros moleculares do solo para detectar mudanças nos sistemas de cultivos, e quando estes são realizados, poucas análises referentes a composição e comunidade microbiana são realizados, percebe-se que a avaliação mais concreta e profunda sobre a comunidade microbiana nem sempre é avaliada nos experimentos dentro do cultivo do cafeeiro arábica, tornando necessário o estudo sobre a mudança da comunidade microbiana dos solos submetidos a diferentes manejos no cultivo de café arábica no Brasil.

2.2 Aplicação de agrotóxicos via solo

Utiliza-se na legislação brasileira, de acordo com a Lei Federal 7.802 de 11 de julho de 1989, Artigo 2º, Inciso I, a e b, o termo e a definição de agrotóxicos como:

“Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de

outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, assim como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 1989).

No entanto, no mercado brasileiro o termo “agrotóxico” atualmente não é utilizado, utiliza-se o termo “defensivos químicos”, o mesmo tem a mesma definição de agrotóxico, pesticidas, praguicidas ou produtos fitossanitários. De acordo com INCA (2009), o Brasil é o maior consumidor de defensivos químicos, com o consumo médio de 5,2 kg de venenos agrícolas por habitante, ainda assim o país saltou de 2 bilhões de dólares para mais de 7 bilhões entre 2001 a 2008 gastos com defensivos químicos, alcançando valores recorde em 2011, com equivalente a 8,5 bilhões de dólares gastas com defensivos químicos.

Os defensivos químicos comerciais têm em sua formulação os principais componentes chamados de ingredientes ativos, sendo estes misturados com ingredientes inertes, os quais por sua vez são inativos, possibilitando melhor controle e aplicação mais eficiente (WAXMAN, 1998). Os defensivos químicos são classificados segundo seu organismo alvo como inseticidas, fungicidas, herbicidas, desfolhantes, fumigantes, rodenticidas ou raticidas, nematocidas, acaricidas, formicidas, carrapaticidas, dentre outros. Ganhando destaque para os ingredientes ativos mais utilizados entre os anos de 2012 a 2016 no Brasil os herbicidas como o glifosato, 2,4-D ácido, atrazina, haloxifope-p-metílico, lactofem, diquate, flumetsulam e imazetapir. Dentro da classe dos inseticidas os clorpirifós, metaxifenoazida, acefato, metomil, teflubenzurom, imidacloprido e lambda cialotrina ganham destaque, já para os fungicidas os mais utilizados são o mancozebe, picoxistrobina, azoxistrobina e flutriafol (PIGNATI et al., 2017).

Os autores Pignati et al. (2017) descrevem que no cultivo do café no Brasil em 2015, em uma área plantada com 1.988.272 hectares, utiliza-se 10 litros/hectare em média de defensivos químicos, sendo consumido 19.882.720,00 litros de defensivos químicos no país. No cultivo de café a utilização de herbicidas, fungicidas e inseticidas pode ser um grande fator para alcançar altas produtividades.

Os herbicidas são agentes biológicos ou substâncias químicas capazes de suprimir e ou matar o crescimento de espécies microbianas específicas. As substâncias químicas podem ser orgânicas e inorgânicas, sendo a primeira amplamente utilizada, e a segunda utilizada antigamente como NaCl e H₂SO₄ (ROMAN et al., 2005). A classificação dos herbicidas ocorre

por meio do agrupamento do mecanismo de ação em grupos, sendo que estes visam apenas algumas proteínas ou processos entre o enorme alcance presente nas plantas. Sendo presentes 18 grupos de herbicidas classificados por modo de ação de acordo com o Comitê Global de Ação de Resistência a Herbicidas (HRAC-BR, 2021).

O glifosato está presente no grupo G, sendo seu mecanismo de ação inibidor da 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) presente no grupo químico da glicina substituída, sendo o Glifosato Original® um dos seus nomes comerciais. O Oxifluorfen é um herbicida comercial do grupo E, no qual seu mecanismo de ação é a capacidade de inibir da protox, presente no grupo químico dos difeniléteres, com ingrediente ativo denominado de oxyfluorfen. Já o Clorimuron etílico é pertencente ao grupo B, inibidor da Aceto Lactato Sintase (ALS), pertencente ao grupo químico das sulfoniluréias, tendo como ingrediente ativo o chlorimuron-ethyl (ROMAN et al., 2005).

No solo, os herbicidas aplicados devem apresentar características de: atividade e nível residual variável, podem necessitar de incorporação para reduzir a volatilização e a fotodecomposição, ser degradados por microrganismos do solo, e em condições de alta umidade e a temperatura adequada favorecerem sua decomposição (ROMAN et al., 2005). Deve-se lembrar de que neste trabalho as condições abióticas foram controladas.

No manejo de café utiliza-se inseticidas com objetivo de controle de pragas, como exemplo no controle do bicho-mineiro, no qual seu controle é realizado por meio da pulverização na parte aérea ou aplicação via solo (via drench ou fertirrigação), como é o caso dos granulados sistêmicos (DIEZ-RODRIGUEZ et al., 2006). Sendo a ação e o poder residual desses inseticidas depende da atividade de seus metabólitos, natureza química, dose e da época de aplicação dentro do período chuvoso (SOUZA et al. 1998).

De acordo com Stenersen (2004), os neonicotinóides são uma nova classe de inseticidas, mais seguros para o homem e o meio ambiente, relacionados estrutural e funcionalmente à nicotina e que atuam ao nível de receptores nicotínicos da acetilcolina. O inseticida comercial Tiametoxam 250 WG é um composto presente no grupo químico dos neocotinóides, com modo de ação agonista da acetilcolina, afetando o processo de transmissão sináptica em pragas, assim como o produto comercial Imidacloprido e flutriafol, este por sua vez está presente no mesmo grupo químico dos neocotinóides, com o mesmo modo de ação, afetando também a transmissão sináptica, entretanto seu ingrediente ativo é formado por imidacloprido mais a mistura com um ingrediente ativo fúngico do grupo químico dos triazóis, denominado de flutriafol. Matuo et al. (2008) descrevem que a utilização de inseticidas misturados com ingrediente ativo fungico, com o objetivo da aplicação líquida no solo, em substituição aos produtos formulados em grânulos, possuem baixa

toxicidade. Já o Clorpirifós um inseticida comercial do grupo químico dos organofosforados é inibidor da enzima acetilcolinesterase, afetando a transmissão sináptica, e tem seu ingrediente ativo denominado de clorpirifós. Os microrganismos podem utilizar destes inseticidas como fonte de energia, devido a sua composição molecular conter moléculas de carbono, oxigênio, enxofre, nitrogênio e fósforo.

Os fungicidas, como o produto comercial Tebuconazol e trifloxistrobina, composto pelos ingredientes ativos de trifloxistrobina e tebuconazol, são classificados com fungicida mesostêmico e sistêmico dos grupos químicos estrubilurina e triazol. No manejo do café este produto comercial tem a finalidade de controlar a seca-dos-ponteiros (*Phoma costaricensis*), bem como pode ser utilizado no manejo de outras culturas. Segundo Campos et al. (2015) a aplicação de tecubonazol + trifloxistrobina não inibe a colonização micorrízica e não compromete a preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos do solo.

No solo, a degradação dos defensivos é mediada pelos microrganismos do solo, ou seja, pelo processo de degradação microbiológica, no qual está é realizada principalmente por bactérias e fungos. Assim, a partir deste mecanismo os microrganismos podem reduzir o nível do resíduo no solo transformando estas substâncias químicas em metabólitos, carbono e água. Além do mais, sabe-se que herbicidas, inseticidas e fungicidas podem ser utilizados por estes microrganismos como fonte de energia, a partir da utilização de fontes de carbono, bem como fósforo e outras fontes de energia presentes na composição molecular de algumas moléculas de defensivos químicos. Entretanto, a degradação de resíduos químicos presentes nos defensivos no solo também depende da ação química (oxidação, redução, hidrólise, dentre outros) e de fatores físicos do solo (fotodecomposição) além de depender de fatores ambientais como pH, temperatura, umidade, condições de fertilidade e matéria orgânica do solo para ocorrência da degradação microbiológica (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011; PIERZYNSKI et al., 1994).

2.3 A comunidade microbiana no solo

Os microrganismos são os grupos mais abundantes da fração biológica do solo, podendo ser encontrados organismos de diferentes grupos como as bactérias, arqueias, fungos, protozoários e vírus (BARROS et al., 2010; VILAS BOAS; MOREIRA, 2012). Estima-se que as comunidades microbianas apresentam grande número de indivíduos em uma grama de solo (com valores entre 10^7 e 10^9 células por grama de solo) e uma diversidade estimada entre 4.10^3 a 5.10^4 espécies (GREEN; BOHANNAN, 2006; ROESCH et al., 2007). Dentre os microrganismos mais abundantes no solo, destacam-se o grupo das bactérias e das arqueias,

representando cerca de mais de 10^{30} indivíduos no mundo, sendo estes considerados com a maior diversidade filogenética e fisiológica entre os seres vivos (PROSSER et al., 2007). No entanto, a diversidade de microrganismos é tão grande quanto desconhecida, é conhecido que a diversidade de microrganismos no mundo é alta, mas não se sabe sobre a verdadeira extensão desta diversidade microbiana (DUNLAP, 2001).

O funcionamento da comunidade microbiana do solo é importante para o entendimento dos processos em nível de ecossistema (CHÁVEZ et al., 2011), como ciclagem de nutrientes, o processo de decomposição de material orgânico do solo, dentre outros. A atividade microbiana do solo é responsável por importantes processos, como sua participação nos ciclos biogeoquímicos como no do nitrogênio, fósforo, enxofre e carbono no solo, controlando sua disponibilidade pelos processos de mineralização e imobilização (GAMA-RODRIGUES et al., 2005; BARRETO et al., 2008). Ainda assim, pode-se dizer que a atividade metabólica e bioquímica dos microrganismos podem proporcionar respostas rápidas às mudanças dentro do ambiente, tornando esta atividade uma indicadora da qualidade do solo (FAUST; RAES, 2012; SIX et al., 2006).

No entanto, deve-se atentar de que a maioria dos papéis realizados pela comunidade microbiana do solo ainda não foi descrita, pois a maior parte destes microrganismos não é cultivável em meio de cultura, sendo necessário o desenvolvimento e a utilização de técnicas independentes de cultivo para os acessos dos mesmos.

2.4 O efeito do manejo agrícola na composição da comunidade microbiana do solo

Os ecossistemas naturais apresentam uma interação harmoniosa entre a cobertura vegetal e os fatores físicos, químicos e biológicos do solo. No entanto, a atividade antropológica por meio do cultivo agrícola pode modificar a interação entre estes fatores (SILVA et al., 2007).

A modificação da estrutura da comunidade microbiana do solo pode ser influenciada pelos tratos culturais adotados em áreas agrícolas, como por exemplo, na adoção de sistema de rotação de culturas e/ou um sistema de monocultivo. Rodrigues et al. (2013) descrevem em seus resultados que a composição da comunidade bacteriana foi significativamente alterada pela conversão da floresta em pastagem. Os autores ainda relatam que a conversão de florestas para monocultivo com pastagem pode alterar a diversidade microbiana do solo, bem como induzir na perda da biodiversidade e funções do microbioma do solo.

Ainda assim, a diversidade microbiana do solo está altamente associada a grande diversidade de plantas, onde as plantas associam-se aos microrganismos de forma que permitem

interagir ao longo de seu desenvolvimento. A estrutura diferencial das raízes, a exsudação e as fontes diversificadas de material orgânico de cada espécie encontrada nos cultivos agrícolas com diversidade vegetal pode incentivar a biodiversidade microbiana do solo (ANDREOTE; SILVA, 2017).

Segundo Raaijmakers et al. (2009), a rotação de culturas pode estimular populações antagônicas, que afetam negativamente o crescimento e a atividade de agentes microbianos patogênicos. Adicionalmente, os diferentes resíduos vegetais aportados sobre o solo influenciam a biomassa microbiana, podendo ocasionar um efeito seletivo da rizosfera ou efeito indireto por meio das diferentes fontes de carbono vegetal orgânico, sendo que o carbono liberado desta decomposição contribui para o aumento da atividade microbiana do solo (ALVES et al., 2011).

O manejo do solo é peça chave na manutenção da atividade e da composição da comunidade microbiana do solo. Portanto, os sistemas de produção (sistema de plantio direto, cultivo convencional, sistemas agroecológicos, dentre outros) e suas práticas são determinantes para a avaliação dos atributos químicos, físicos e também biológicos do solo (VEZZANI; MIELNICZUK, 2009).

De forma intrínseca ao sistema de manejo, outras variáveis também podem interferir de forma direta na fração viva do solo. Como o manejo de fertilizantes, tanto em doses, como em formas de aplicação, podem variar muito de forma dependentes do sistema de cultivo utilizado. Em áreas de plantio direto a adição de fertilizantes acontece nas linhas de plantio na subsuperfície do solo, e no sistema convencional a adubação pode ocorrer a lanço na superfície do solo sendo os fertilizantes e corretivos misturados e a camada superficial do solo mobilizada. Estas práticas podem afetar a atividade metabólica dos microrganismos no solo, como exemplo, na modulação da enzima fosfatase ácida, que pode ter sua atividade diminuída quando o fosforo inorgânico é disponibilizado no solo (CLHARHOLM, 1993; SCHLINDWEIN; ANGHINONO, 2000; SIQUEIRA FERREIRA et al., 2008).

Ainda, pode-se inferir que o sistema de plantio direto é o mais adequado para o cultivo sustentável, não promovendo o revolvimento do solo, o que acarreta em ganhos em aspectos biológicos do solo. Esta característica mantém a matéria orgânica no solo, e preserva ainda a estrutura de rede de hifas de fungos no solo, impedindo assim a modificação da diversidade de microrganismos do solo. Também relacionado ao plantio direto, a palhada do cultivo anterior permanece sobre o solo promovendo ambientes mais adequados para o estabelecimento de diferentes grupos de microrganismos, como maior umidade, e a presença constante de fontes de carbono assimiláveis (SILVA et al., 2010).

Os autores Batista da Silva et al. (2007), avaliando os atributos biológicos do solo sob efeitos de plantas de cobertura e dos sistemas plantio direto e convencional no cultivo de feijoeiro-comum, descrevem que os atributos biológicos do solo são influenciados pelas plantas de cobertura e pelo manejo do solo.

A quantidade e a qualidade da matéria orgânica do solo podem afetar o funcionamento da sua comunidade microbiana, bem como pode influenciar na ciclagem de nutrientes como o nitrogênio e seu processo de mineralização a partir de resíduos culturais, além de que o altos teores de matéria orgânica do solo afetam a atividade e a diversidade de enzimas, influenciando diretamente na alta atividade de acorod com o alto teor de matéria orgânica do solo (BENDINGA; TURNER; JONES, 2002).

2.5 Manejo do solo com plantas de cobertura

As plantas de cobertura são aquelas cultivadas geralmente na entressafra, ou na entrelinha dos cultivos, mais especificamente para produção de massa vegetal destinada à cobertura da superfície do solo (SALTON; TOMAZI, 2014). A sua utilização é uma estratégia capaz de aumentar a sustentabilidade dos agrossistemas, fornecendo benefícios para as culturas de interesse econômico, para o solo e o ambiente, sendo uma alternativa economicamente viável de aprimorar a produtividade agrícola prezando por sua sustentabilidade (GAMA-RODRIGUES et al., 2007).

As plantas de cobertura melhoram a proteção do solo, e promovem efeitos positivos ao longo do tempo, como por exemplo na redução da erosão do solo, diminuição da temperatura e da amplitude térmica do solo, diminui as perdas de água por evaporação e a manutenção de umidade do solo, aumentam a ciclagem e disponibilidade de nutrientes para as plantas cultivadas em sequência, aumentam o material orgânico (carbono) ao solo, além de expressivo impacto na redução da incidência de plantas invasoras (SALTON, TOMAZI, 2014). Tal fato foi observado por Veronese et al. (2012), avaliando o efeito de plantas de cobertura e da calagem sobre a produtividade da soja, onde os autores afirmam que independentemente da calagem as plantas de cobertura como o milheto e a braquiária ocasionam a maior concentração foliar de fósforo e aumenta a produtividade de grãos de soja.

Plantas como as braquiárias (*Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha*), e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR) são utilizadas com frequência, em decorrência ao seu sistema radicular volumoso, formando camada espessa de palhada sobre o solo (ROSSI et al., 2012). Após a dessecação e morte destas plantas, inicia-se o processo de decomposição, deixando

canais e galerias no interior do solo, e consequentemente influenciando em um ambiente favorável para o desenvolvimento e cultivo (SALTON; TOMAZI, 2014).

O uso de brassicaceas como o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) tem grande potencial para ser cultivado no inverno em rotação de culturas no sistema de plantio direto. Esta espécie desenvolve-se bem em solos pobres, suas raízes descompactam o solo, e apresentam maior acúmulo de nutrientes devido à elevada capacidade de ciclagem de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, tornando o nabo uma importante espécie para fazer parte de esquemas de rotação de culturas e cultivo entrelinha (OHLAND et al., 2005).

2.6 Métodos de estudo das comunidades microbianas

A diversidade microbiana pode ser descrita como a soma das diferentes espécies em um determinado ambiente, podendo ser estudada pelos métodos dependentes e independentes de cultivo. Os métodos tradicionais, dependentes de cultivo, são os mais conhecidos e baseiam-se na diferenciação morfológica, metabólica e fisiológica dos microrganismos. É um conjunto de métodos rápidos e econômicos, mas que está associado a limitações, como a seletividade do meio de cultivo, no qual existe uma condição ótima de temperatura e umidade para crescimento e na interação negativa entre as colônias presentes no meio de cultura.

Pode-se enfatizar de que esta técnica utiliza de condições diferentes do ambiente natural de muitos microrganismos (WETLER-TONINI et al., 2011; KELLER; ZENGLER, 2004; TORSVIK et al., 2002). Portanto, a grande maioria das espécies microbianas permanece oculta, limitando severamente sua caracterização taxonômica e funcional. Desta maneira, para abordar questões relacionadas ao conjunto microbiano de uma dada amostra, onde a maioria dos organismos deve ser representada na análise, foram desenvolvidos métodos que permitem inferir sobre a taxonomia e prever a função dos microrganismos no ambiente sem a necessidade de cultivo (KONSTANTINIDIS et al., 2017).

Os métodos independentes de cultivos fornecem dados mais refinados e podem ser utilizados por técnicas de estudo do DNA ambiental. O acesso a genes específicos, como por meio dos métodos de reação em cadeia da polimerase monitorada em tempo real (qPCR), ou por meio do sequenciamento de genes filogenéticos ou funcionais, podem fornecer informações sobre a organização e a quantidade de grupos microbianos específicos no ambiente (HUANG et al., 2009). Dessa maneira, pode-se estudar as comunidades de bactérias e fungos dentro de um nicho ecológico, permitindo sua identificação independentemente de sua morfologia e de técnicas dependentes de cultivo (AVIO et al., 2009). Há ainda métodos que utilizam todo o

conjunto genético de uma amostra, como a metagenômica, para inferir sobre os grupos presentes e as funções executadas por estes.

Há também, métodos independentes de cultivos mais simples, dentre os quais podemos destacar as metodologias de avaliação do carbono da biomassa microbiana do solo, a respirometria ou a atividade biológica do solo, baseada na atividade de enzimas específicas.

A quantificação do carbono da biomassa microbiana se refere a quantificação do carbono que a biomassa microbiana do solo imobiliza em suas células (INSAM, 2001). Esta estimativa associada com outras metodologias como a respiração basal do solo (reflete a atividade microbiológica do solo) podem gerar índices como o qCO_2 (quociente metabólico) e assim dar base a comparações entre manejos (INSAM, 2001; ALVES et al., 2011). No entanto, apenas a avaliação destes parâmetros não fornece informações concretas sobre a atividade microbiana do solo, pois pode ocorrer no solo elevadas quantidades de biomassa inativa, sendo assim necessário o estudo de parâmetros que medem a atividade microbiana para avaliar o estado metabólico atual e potencial dessas comunidades (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A avaliação da atividade biológica do solo pode ser realizada por meio da quantificação das enzimas arilsulfatase, fosfatase ácida e β -glucosidade, permitindo a detecção de mudanças de manejo do solo entre tratamentos (MENDES; REIS JUNIOR, 2004). Outro ponto de destaque é que este tipo de análise se dá pelo fato de que as quantificações destas enzimas mostram variações de forma mais rápida quando comparado com os atributos físicos e químicos do solo (TEJADA et al., 2006). Os autores Da Silva et al. (2009) descrevem que os atributos microbiológicos como carbono da biomassa microbiana, atividade enzimática da arilsulfatase e fosfatase ácida são mais sensíveis para diferenciar a mudanças de manejo de solos de cerrado, quando comparados com os atributos físicos e químicos.

2.7 Atividade de enzimas do solo

O processo de decomposição do material orgânico do solo é mediado por enzimas que podem ser secretadas por células vivas ou liberadas por células após a lise celular (exógenas e/ou endógenas). Estas enzimas são produzidas principalmente por microrganismos do solo (bactérias, arqueias e fungos) e também por alguns vegetais, e tem como principal função despolimerização e a mineralização de compostos orgânicos do solo, fornecendo assim os nutrientes derivados do processo de decomposição aos organismos que as sintetizam (GESSNER et al., 2010; STOTT et al., 2010).

Deve-se lembrar que fatores abióticos (temperatura, umidade, pH, fertilidade, granulometria do solo, dentre outros) podem modular a comunidade microbiana de solos e consequentemente sua atividade enzimática, sendo esta atividade uma importante ferramenta para a identificação de perturbações nos sistemas agrícolas e florestais, proporcionada pela alta sensibilidade dos microrganismos (GIL-SOTRES et al., 2005; BLAGODATSKAYA; KUZYAKOV, 2008).

A avaliação da atividade enzimática do solo pode estar associadas: a células microbianas ativas, intracelulares ou anexadas à superfície celular externa; a restos de células ou células mortas; a células em repouso, como esporos bacterianos; podem ser liberadas como enzimas verdadeiramente extracelulares para degradar substratos insolúveis ou de alto peso molecular; podem apresentar-se como enzimas extracelulares de complexos enzima-substratos; podem estar presentes como enzimas extracelulares livres; podem se apresentar como enzimas extracelulares estabilizadas por sua associação com partículas reativas à superfície (por exemplo, minerais de argila, óxidos e hidróxidos de ferro); e, ainda preso pela matéria húmica (os complexos húmus-enzima) (BURNS, 1982).

As principais enzimas estudadas são as hidrolases, estas catalisam reações de clivagem de ligações com posterior liberação de uma molécula de água, dentre as quais encontram-se enzimas como amilase, celulase, xilanase, protease, invertase, arilsulfatase e fosfatases (DICK; TABATABAI, 1999; SANTOS; MAIA, 2013).

A atividade da arilsulfatase pode ser utilizada como indicadora da presença de fungos no solo, uma vez que entre os componentes da biomassa microbiana do solo, somente os fungos conseguem produzir ésteres de sulfatos (substrato para a atividades desta enzima) (BANDICK; DICK, 1999). Segundo Lisboa et al. (2012), os fungos são os principais microrganismos componentes da biomassa microbiana que possuem em sua composição ésteres de sulfato, substrato para a atividade enzimática da arilsulfatase.

As arilsulfatases são enzimas constitutivas, sendo sua síntese controlada pelo conteúdo de carbono e enxofre no solo. Estas enzimas hidrolisam ésteres de sulfato com um radical aromático (ésteres fenólicos de ácido sulfúrico) e foram originalmente descritas como fenolsulfatases. Sua atividade depende do conteúdo de sulfato e nutrientes no solo, os quais podem ser tanto requisitados para complementar a nutrição do enxofre, ou competir com este elemento por cargas ou outros interferentes químicos presentes no solo (BALOTA et al., 2010). A arilsulfatase tem sua atividade modulada pelas variações encontradas entre as épocas úmidas e secas do ano, sendo encontrado valores mais elevados na época úmida. Balota et al. (2010), avaliando a atividade enzimática do solo cultivado com diferentes espécies de leguminosas

consorciadas com café arábica, descrevem que a atividade da arilsulfatase variou de 10,6 a 14,9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de *p*-nitrofenolsulfato e que sua atividade apresentou incremento de até 39% nas entrelinhas com *Leucaena leucocephala* em comparação com o controle.

No solo o grupo de enzimas das glicosidades tem uma ampla distribuição, justamente pela grande diversidade de ligações glicosídicas e variações em seus substratos, além da β -glucosidase existem outras enzimas dentro deste grupo que são distribuídas no solo (α -glucosidase, α - e β -galactosidase) realizando diferentes reações (MARTINEZ; TABATABAI, 1997; ALMEIDA; NAVES; MOTA, 2015). Essa enzima é encontrada em plantas, animais, fungos, bactérias e até leveduras (VEENA et al., 2011).

Dentro do processo de degradação da matéria orgânica do solo desde da celulose até a glicose o grupo das glucosidases atuam em diferentes etapas, assim as endoglucanases atuam clivando ligações beta dentro da molécula da celobiose, as celobiohidrolases atuam removendo as unidades de celobiose das extremidades das cadeias de celulose e, as moléculas de celobioses são clivadas pela β -glucosidase, liberando glicose no processo final de quebra da celulose (SILVA; GOUVEIA, 2008) (Figura 01).

Figura 01. Estrutura molecular da celulose e local de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glucosidase. Fonte: Kumar, Sompal, Singh (2008).

Dessa maneira a β -glucosidase desempenha um papel importante na degradação da matéria orgânica do solo e dos resíduos vegetais, pois catalisa a hidrólise de β -d-glucopiranosídeos no passo final da decomposição da celulose, fornecendo açúcares simples para a população de microrganismos do solo (STOTT et al., 2010). É considerada uma das indicadoras de qualidade do solo mais utilizada, está associada ao ciclo do carbono e tem a capacidade de indicar mudanças no manejo do solo com maior eficiência/rapidez devido a sua alta sensibilidade a alterações no sistema solo (MARTINEZ; TABATABAI, 1997). Segundo

Almeida et al. (2015) a atividade da β -glucosidase diminui em ambientes de baixa umidade, de alta salinidade e baixas temperaturas, bem como a quantidade e à qualidade da matéria orgânica do solo influencia sua atividade.

No solo, os compostos de fósforo-orgânico são constituídos por fitinas, ácidos nucleicos, fosfolipídios e seus derivados (CASIDA, 1959), sendo estes hidrolisados por enzimas dos grupos das fitases, nucleases e fosfolipases, podendo formar, no final do processo de hidrólise, fosfomonoésteres que são hidrolisadas pelas fosfomonoesterases (PANG e KOLENKO, 1986).

As fosfomonoesterases são um grupo de enzimas que incluem fosfomonoesterase ácida e alcalina e hidrolisam ligações monoéster, incluindo mononucleotídeos e fosfatos de açúcar. Essas enzimas são conhecidas genericamente pelo nome de fosfatases e catalisam a hidrólise de compostos fosfatados orgânicos com a produção de fósforo solúvel (MARTINEZ; TABATABAI, 1997; TABATABAI, 1994). A atividade enzimática da fosfatase ácida prevalece em solos com pH em até 6,5, além disto tem-se conhecimento de que a atividades desta enzima pode ser modulada pela época do ano (períodos mais secos e mais úmidos) (SCHNEIDER et al., 2001).

As fosfatases são um grupo de enzimas que são secretadas pelas raízes de plantas e por microrganismos, sendo a fosfatase ácida secretada principalmente por plantas da família das gramíneas, estão presentes no solo catalisando a hidrólise de ésteres de fosfatos, liberando fosfato solúvel a partir do fósforo orgânico, sua atividade é influenciada pelos valores de fósforo no solo, no qual solos com baixo teor de fósforo inorgânico possuem maior atividade enzimática da fosfatase ácida, quando comparado a solos com alto teor de fósforo inorgânico (SPEIR; COWLING, 1991); DINKELAKER; MARSCHNER, 1992). A aplicação de fontes de fósforo inorgânico no solo pode inibir a síntese de fosfomonoesterases justamente pelo fato de que sua adição inibe a expressão dos genes PHO (HALSTEAD 1964; LIMA et al., 1996; MOSCATELLI et al., 2005; NANNIPIERI et al., 1978; OLANDER; VITOUSEK, 2000).

Sabe-se que nenhuma atividade enzimática única pode fornecer uma imagem completa do funcionamento metabólico do solo, no entanto a atividade crescente da β -glucosidase pode fornecer a compreensão de que a biomassa microbiana do solo está concomitantemente em crescimento, possibilitando a maior capacidade do solo em decompor resíduos de plantas e melhorar a disponibilidade de nutrientes para cultivos subsequentes (STOTT et al., 2010).

2.8 Sequenciamento da Nova Geração (NGS)

Os sequenciadores da nova geração são automatizados e desenvolvidos com o objetivo de ampliar a genotipagem, aumentando assim a quantidade de sequências analisadas, suportando uma inferência mais efetiva dos genes estudados em um dado ambiente. A velocidade de obtenção de informações do NGS é maior e com menor custo do que a possibilitada por meio do sequenciamento de Sanger, inicialmente utilizada para estes estudos (LIU et al., 2012).

Em 2010, a plataforma Illumina GA/HiSeq foi criada com a capacidade de gerar 600 Gb por corrida. No entanto, outras plataformas mais compactas, denominadas de plataformas de bancada (*bench top*) também foram criadas, dentre as quais tem destaque a Illumina MiSeq, que consiste no sequenciamento baseado na síntese (SBS), onde uma fita de DNA se liga a adaptadores presentes na placa (*Flowcell*), sendo amplificada clonalmente em fase sólida por PCR em ponte (*Bridge PCR*), de maneira a permanecerem próximas, criando *clusters*, que irão conter milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA. Após a aplicação de uma enzima de linearização, as fitas *double stranded DNA* (*dsDNA*) são convertidas em *single stranded DNA* (*ssDNA*). Deoxinucleotídeos contendo diferentes marcadores fluorescentes cliváveis e uma região bloqueadora removível são adicionados à placa, possibilitando a síntese de nova fita e o sequenciamento, realizado base-a-base. Outra opção deste tipo de equipamento é o Ion PGM, que proporciona uma geração de dados menor (80 Mb – 2Gb), com a capacidade de leitura entre 200 a 400 bp, e utiliza tecnologia de chips semicondutores com detecção de íons H^+ , além de sua análise de dados ser realizada fora do aparelho (realizada num servidor).

Atualmente o uso de ferramentas que possibilitam conhecer sobre a filogenia molecular microbiana, vem proporcionando mudanças dentro do mundo científico, possibilitando mudanças na compreensão evolutiva, sobre diversidade e até sobre o significado do papel ecológico de microrganismos, principalmente das bactérias. No século 21 percebe-se no mundo científico uma reestruturação da biologia, graças as influências do sequenciamento genômico (DUNLAP, 2001).

O sequenciamento da nova geração (NGS) é uma técnica importante para a agricultura, possibilitando por meio do sequenciamento de amostras de solos, explorar a diversidade de espécies microbianas (PINTO; RASKIN, 2012). Assim, a partir dele pode-se descobrir sobre a participação ecológica das comunidades microbianas nos sistemas agrícolas, sobre sua interação com outros organismos, plantas, sua participação nos processos que englobam os ciclos biogeoquímicos, processo de mobilização e imobilização de nutrientes, na decomposição

da matéria orgânica do solo, dentre vários outros, frisando ainda mais sobre a importância de estudos metagenômicos na agricultura (URBANOVA; PICEK, BARTA, 2011).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. F.; NAVES, E. R.; MOTA, R. P. Soil quality: Enzymatic activity of soil β -glucosidase. **Global Journal of Agricultural Research and Reviews**, v. 3, p. 146-150, 2015.
- ALBÁN, R.; GUERRERO, R.; TORO, M. Interactions between a root knot nematode (*Meloidoyne exigua*) and arbuscular mycorrhizae in coffee plant development (*Coffea arabica*). **American Journal of Plant Sciences**, v.4. p.19-23, 2013.
- ALVARENGA, S. M.; CAIXETA, E. T.; HUFNAGEL, B.; THIEBAUT, F.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.890-898, 2011.
- ALVES, T. DOS, 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**, v.33, p.341-347, 2011.
- ANDREOTE, F.D.; SILVA, M.C.P. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. **Current Opinion in Microbiology**, v.37, p.29-34, 2017.
- ARRUDA, A. C.; MINIM, V. P. R.; FERREIRA, M. A. M.; MINIM, L. A.; SILVA, N. M. DA; SOARES, C. F. Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p.754-763, 2009.
- AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically diferente isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p.242-253, 2009.
- AZEVEDO JUNIOR, R. R.; SANTOS, J. B.; BARETTA, D.; RAMOS, A. C.; PEREIRA, A. P. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Chemical and microbiological soil properties in organic and conventional management systems of *Coffea arabica* L., **Journal of Plant Nutrition**, v.40, p. 2076-2086, 2017. DOI: 10.1080/01904167.2017.1346128
- BALOTA, E. L.; CHAVES, J. C. D. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1573-1583, 2010.
- BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology Biochemistry**, v.31, p.1471-1479, 1999.
- BARROS, Y. J.; MELO, V. DE F.; DIONÍSIO, J. A.; DE OLIVEIRA, E. B.; CARON, L.; KUMMER, L.; DE AZEVEDO, J. C. R.; SOUZA, L. C. DE P. Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo. I – Microrganismos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1397-1411, 2010.
- BARRETO, P.A.B.; GAMA-RODRIGUES. E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F.; FONSECA, S. Atividade, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em plantações de eucalipto, em uma sequência de idades. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.611-619, 2008.
- BLAGODATSKAYA, E.; KUZYAKOV, Y. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.115–131, 2008.

- BATISTA DA SILVA, M.; KLIEMANN, H. J.; SILVEIRA, P. M. DA; LANNA, A. C. Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1755-1761, 2007.
- BENDINGA, G. D.; TURNER M. K.; JONES, J. E. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p. 1073-1082, 2002.
- BOHM, G. M. B.; SCHENEIDER, L.; CASTILHOS, D.; AGOSTINETTO, D; ROMBALDI, C. V. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 919-930, 2011.
- BRASIL. **Lei Federal nº 7802 de 11 de julho de 1989**. Dispoe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.
- BURNS, R. G. Enzyme activity in soil location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, p. 423-427, 1982.
- CAFFARO-FILHO, R. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L. R. Quantitative analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.736-738, 2007.
- CAMPOS, A.A.B.; SCOTTON, J.C.; COSTA, W.L.F.; GIASSI, V.; PINTO, D.F.P.; HOMMA, S.K. Seleção de fungicidas visando à preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos no cultivo do feijoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, p.898–902, 2015.
- CASIDA JR., L. E. **Phosphatase activity of some common soil fungi**. Soil Science, v. 87, p. 305-310, 1959.
- CECAFÉ. Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. Relatório mensal de exportações: abril de 2021. **Cecafé**, 2021.
- CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I.; CARVALHO, P. C. DE F.; MEURER, E. J. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1254-1261, 2011.
- CLHARHOLM, M. Microbial biomass P, labile P and acid phosphatase activity in the humus layer and spruce forest, after repeated additions of fertilizers. **Biology and Fertility of Soils**, v.16, p.287-292, 1993.
- COMITÊ GLOBAL DE AÇÃO DE RESISTÊNCIA A HERBICIDAS – HRAC-BR. **Modo de ação de herbicidas**. Disponível em: < <https://www.hrac-br.org/modo-de-acao>> Acesso em: 21 de set. 2021.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de café, Safra 2020. **Conab**, v.1, p.1-104, 2020.
- CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. culturas de cobertura e sua influência na fertilidade do solo sob sistema de plantio direto (SPD). **Bioscience Journal**, v.24, p.20-31, 2008.
- DA SILVA, L. G.; MENDES, I. DE C.; REIS JUNIOR, F. B.; FERNANDES, M. F.; MELO, J. T. DE; KATO, E. Atributos físicos, químicos e biológicos de um Latossolo de cerrado em plantio de espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.613-620, 2009.

- DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v.29, p.1–10, 2013.
- DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING JR., F. B. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel Dekker. 1999. p.95-127.
- DIEZ-RODRÍGUEZI, G. I.; BAPTISTA, G. C. DE; TREVIZANI, L.R.P.; HADDADI, M.L.; NAVA, D. E. Resíduos de tiametoxam, aldicarbe e de seus metabólitos em folhas de cafeeiro e efeito no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomologia*, v.35, p.257-263, 2006.
- DINKELAKER, B.; MARSCHNER, H. In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. **Plant Soil**, v.144, p.199–205, 1992.
- DUNLAP, P. V. Microbial Diversity. **Encyclopedia of Biodiversity**, v. 5, p.280-291. 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00435-4280>
- DURKIN, P. **Glyphosate - human health and ecological risk assessment**. Forest Service, 2003, 62 p.
- FAUST, K.; RAES, J. Interações microbianas: de redes a modelos. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.538-550, 2012.
- FARIA, M.V.C. Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F., and MOREIRA, J.C., orgs. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro, 2003. p. 157-175.
- FERNANDES, A. L. T.; PARTELLI, F. L.; BONOMO, R.; GOLYNSKI, A. A moderna cafeicultura dos cerrados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, p.231-240, 2012.
- FONSECA, A. J.; FREITAS, A. F.; CARVALHO, G. R.; CARNEIRO, M. A. C.; VILELA, D. J. M.; FASSIO, L. O. Arbuscular mycorrhizal fungus on the initial growth and nutrition of *Coffea arabica* L. genotypes. **Ciência e Agrotecnologia [online]**, v. 43, p. 1-11, 2019.
- FREITAS, D. A. F DE; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; CURI, N. Índices de qualidade do solo sob diferentes sistemas de uso e manejo florestal e cerrado nativo adjacente. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, p.417-428, 2012.
- GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMARODRIGUES, A.C. & SANTOS, G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.393-901, 2005.
- GAMA-RODRIGUES, A. C. DA; GAMA-RODRIGUES, E. F. DA; BRITO, E. C. DE. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais de plantas de cobertura em argissolo vermelho-amarelo na região noroeste Fluminense (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1421-1428, 2007.
- GESSNER, M. O.; SWAN, C. M.; DANG, C. K.; MCKIE, B. G.; BARDGETT, R. D.; WALL, D. H.; HA'TTENSCHWILER, S. Diversity meets decomposition. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, p.372-380, 2010.
- GREEN, J., BOHANNAN, J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, v.21, p.502-507, 2006.
- GIL-SOTRES, F.; CEPEDA-TRASAR, C.; LEIRÓS, M.C. & SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.877-887, 2005.
- HALSTEAD, R. L. Phosphatase activity of soils as influences by lime and other treatments. **Canadian Journal of Soil Science**, v.44, p.137–144, 1964.
- HUANG, W.E.; FERGUSON, A.; SINGER, A.C.; LAWSON, K.; THOMPSON, I.P.; KALIN, R.M.; LARKIN, M.J.; BAILEY, M.J. & WHITELEY, A.S. Resolving genetic functions within microbial populations: In situ analyses using rRNA and mRNA stable isotope

- probing coupled with single-cell Raman-fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.234-241, 2009.
- INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, v.100, p.389-402, 2001.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco/alimentacao/agrotoxicos>>. Acesso em: 03 de agosto de 2018.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.141-150, 2004.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. **The ISME Journal**, v.10, p.1-8, 2017.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.377-391, 2008.
- LAMMEL, D. R.; AZEVEDO, L. C. B.; PAULA, A. M.; ARMAS, R. D.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Atributos microbiológicos e da fauna do solo com diferentes sistemas de cultivo de cafeeiro no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, p.894-905, 2015.
- LIMA, J. A.; NAHAS, E.; GOMES, A. C. Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. **Applied Soil Ecology**, v.4, p.75-82, 1996.
- LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, A. O. MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 45-55, 2012.
- LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.1, p.11, 2012.
- MACHADO, L. V.; RANGEL, O. J. P.; MENDONÇA, E. S.; MACHADO, R. V.; FERRARI, J. L. Fertilidade e compartimentos da matéria orgânica do solo sob diferentes sistemas de manejo. **Coffee Science**, v. 9, p. 289-299, 2014.
- MATUO, T.K.; RAETANO, C.G.; MATUO, T.; MARTINELL, N.M.; LEITE, G.J. Desenvolvimento de equipamento motorizado para aplicação líquida de produtos fitossanitários na cultura do café. **Engenharia Agrícola**, v.28, p.543-553, 2008.
- MARTINEZ, C., TABATABAI, M. Decomposition of biotechnology by-products in soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, p.625-632, 1997.
- MENDES, I. DE C.; REIS JUNIOR, F.B. **Uso de parâmetros microbiológicos como indicadores para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas**. 1ª Edição. Brasília, Embrapa, 2004.
- MOSCATELLI, M. C.; LAGOMARSINO, A.; DE ANGELIS, O.; GREGO, S. Seasonality of soil biological properties in a poplar plantation growing under elevated atmospheric CO₂. **Applied Soil Ecology**, v.30, p.162-173, 2005.
- NANNIPIERI, P.; JOHANSON, R. L.; PAUL, E. A. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v.10, p.223-229, 1978.
- NUNES, L. A. P. L.; DIAS, L. E.; BARROS, I. J. N. F.; KASUYA, M. C. M.; CORREIA, E. F. Impacto do monocultivo de café sobre os indicadores biológicos do solo na zona da área remanescente de Cerrado mineira. **Ciência Rural**, v.39, p.2467-2474, 2009.
- OHLAND, R. A. A.; SOUZA, L. C. F. DE; HERNANI, L. C.; MARCHETTI, M. E.; GONÇALVES, M. C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, p.538- 544, 2005.
- OLANDER, L. P.; Vitousek, P. M. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. **Biogeochemistry**, v. 49, p.175-190, 2000.

- OLIVEIRA, M.F. DE; BRIGHENTI, A.M. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR, 2011, p. 263-304.
- PANG, P. C. K.; KOLENKO, H. Phosphomonoesterase activity in forest soils. **Soil Biology Biochemistry**, v.18, p.35–40, 1986.
- PERDONÁ, M. J.; SORATTO, R. P.; ESPERANCINI, M. S. T. Desempenho produtivo e econômico do consórcio de cafeeiro arábica e noqueira-macadâmia. **Pesquisa e Agropecuária Brasileira**, v.50, p.12-23, 2015.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton, CRC Press, 1994. 313p
- PINTO, A. J.; RASKIN, L. PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. **Plos One**, v. 7, p.1-16, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043093.
- PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; GAST, C. J. V. D.; YOUNG, J. P. W. Essay – The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.384-392, 2007.
- PIGNATI, W.A.; LIMA, F. A. N. DE S.; LARA, S. S. DE; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. DA C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, p.3281-3293, 2017.
- PREZOTTI, L.C.; ROCHA, A.C. Nutrição do cafeeiro arábica em função da densidade de plantas e da fertilização com NPK. **Bragantia**, v.63, p.239-251, 2004.
- RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. A rizosfera: um campo de jogos e campos de batalha para patógenos transmitidos pelo solo e microorganismos benéficos. **Plant Soil**, v.321, p.341-361, 2009.
- RAYNAUD, X.; NUNAN, N. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. **Plos One**, v.9, p.1-8, 2014.
- RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEKD, K.; JESUSE, E. DA C.; PAULA, F.S.; MIRZAA, B.; HAMAOUJI JR., G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J.M.; BOHANNAN, B.J.M.; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **PNAS**, v.110, p.988–993, 2013.
- RODRIGUES, R. N.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. DE C.; ROCHA, O. C.; GUERRA, A. F.; VEIGA, A. D.; MENDES, I. DE C. Soil enzymatic activity under coffee cultivation with different water regimes associated to liming and intercropped brachiaria. **Ciencia Rural**, v. 52, p.1-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200532>
- ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v.1, p.283–290, 2007.
- ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; HALL, L.; BECKIE, H.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação**. 2005. 125p.
- ROSSI, C. Q.; PEREIRA, M. G.; GIÁCOMO, S. G.; BETTA, M.; POLIDORO, J. C. Frações lábeis da matéria orgânica em sistema de cultivo com palha de braquiária e sorgo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, p.38-46, 2012.

- SALTON, J. C.; TOMAZI, M. **Sistema Radicular de Plantas e Qualidade do Solo**. Comunicado Técnico 198. Embrapa, 2014.
- SAMPAIO, D. B.; SANTOS, V. B. DOS; ARAÚJO, A. S. F. DE. Doses de paclobutrazol sobre a biomassa microbiana do solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, p.1349-1354, 2010.
- SANTOS, V. M. DOS; MAIA, L. C. Bioindicadores de qualidade do solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.10, p.195-223, 2013.
- SCHLINDWEIN, J. A.; ANGHINONI, I. Variabilidade vertical de fósforo e potássio disponíveis e profundidade de amostragem do solo no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.30, p.611-617, 2000.
- SCHNEIDER, K.; TURRION, M-B.; GRIERSON, P. F.; GALLARDO, J. F. Phosphatase activity, microbial phosphorus, and fine root growth in forest soils in the Sierra de Gata, western Spain. **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.151-155, 2001.
- SILVA, M.B.; KLIEMANN, H.J.; SILVEIRA, P.M. & LANNA, A.C. Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1755-1761, 2007.
- SILVA, R. R. D.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; MOREIRA, F. M. D. S.; CURI, N.; ALIVISI, A. M. T. Biomassa e atividade microbiana em solos sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica campos das vertentes - MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1585-1592, 2010.
- SILVA, J. C.; GOUVEIA, E. R. Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, p.60-70, 2008.
- SIQUEIRA FERREIRA, A. DE; SILVA DE OLIVEIRA, R.; SANTOS, M. A. DOS; NASCENTES BORGES, E. Atividade respiratória da microbiota e conteúdo de glicose em resposta à adição de fósforo em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1891-1897, 2008.
- 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**, v.70, p.555-569, 2006.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L.O. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. Belo Horizonte, EPAMIG, 1998. 48p
- SOUZA NUNES, R. DE; CASTRO LOPES, A. A. DE; SOUSA, D. M. G. DE; CARVALHO MENDES, I. DE. Sistemas de manejo e os estoques de carbono e nitrogênio em latossolo de cerrado com a sucessão soja-milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1407-1419, 2011.
- STENERSEN, J. **Chemical pesticides: Mode of action and toxicology**. CRC Press, 2004. 276p.
- STOTT, D. E.; ANDREWS, S. S.; LIEBIG, M. A.; WIENHOLD, B. J.; KARLEN, D. L. Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. **Soil Biology & Biochemistry**, v.74, p.107-119, 2010.
- SPEIR, T. W.; COWLING, J. C. Phosphatase activities of pasture plants and soils: relationship with plant productivity and P fertility indices. **Biology and Fertility of Soils**, v.12, 189-194, 1991.
- TABATABAI, M. A. **Enzymes**. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A. & WOLLUM, A., eds. Methods of soil analysis. Microbial and biochemical properties. Madison, Soil Science Society of America, 1994. Part 2. p.775-833.
- TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M.; REIS, E. F. Crescimento vegetativo de mudas de café arábica (*Coffea arabica* L.) submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Coffee Science**, v. 5, p. 251-261, 2010.

- TEJADA, M.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA, C. Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effect on the Soil Biological Properties. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p.1010-1017, 2006.
- TORSVIK, V.; OVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v.296, p.1064–1066, 2002.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos Especiais em Ciências do Solo**, v.2, p.196-275, 2002.
- URBANOVA, Z.; PICEK, T.; BARTA, J. Effect of peat re-wetting on carbon and nutrient fluxes, greenhouse gas production and diversity of methanogenic archaeal community. **Ecological Engineering**, v. 37, p.1017–1026, 2011. DOI: doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.07.012.
- VEENA, V., POORNIMA, P., PARVATHAM, R., SIVAPRIYADHARSINI KALAISELVI, K. Isolation and characterization of β -glucosidase producing bacteria from different sources. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p.14907-14912, 2011.
- VERONESE, M.; FRANCISCO, E. A. B.; ZANCANARO, L.; ROSOLEM, C. A. Plantas de cobertura e calagem na implantação do sistema plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, p.1158-1165, 2012.
- VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.743-755, 2009.
- VILAS BOAS, R. C.; MOREIRA, F. M. de S. Microbiologia do solo no ensino médio de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.295-306, 2012.
- WAXMAN, M. **Agrochemical and pesticide safety handbook**. Boca Raton: Lewis Publishers. 1998. 400p.
- WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. **Revista Virtual Química**, v.3, p.78-87, 2011.

3. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM DIFERENTES CLASSES DE SOLO COM IMPLANTAÇÃO DE CAFÉ E CULTIVO DE MILHETO

Resumo

A implantação da cafeicultura exige alterações nas características do solo. No entanto, pouco se sabe sobre como este processo pode promover alterações nas comunidades microbianas dos solos. Desta maneira, objetivou-se avaliar as mudanças na estrutura e na atividade das comunidades microbianas encontradas em diferentes classes de solos presentes numa área de implantação de um cafezal. O trabalho foi conduzido em área experimental de aproximadamente 220 ha, em Patrocínio/MG, onde ocorrem 4 classes de solos. Nesta área foram alocados 74 pontos amostrais, as amostras foram coletadas na profundidade 0 a 10 cm, em três períodos ao longo da implantação do cafezal (setembro/2016, janeiro/2017 e julho/2017). Para estas amostras foram analisadas as atividades enzimáticas de arilsulfatase e β -glucosidase, estrutura da comunidade bacteriana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP), e quantificação das comunidades de fungos e bactérias por PCR quantitativo (qPCR). Os resultados mostram variação espacial nos valores da atividade enzimática para a arilsulfatase ao longo do tempo (setembro/2016 de 12 a 131 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$, janeiro/2017 de 29 a 114 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$ e julho/2017 de 12 a 182 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$) e também variação desses valores de acordo com a classe de solo estudada. A β -glucosidade apresentou comportamento distinto para cada classe de solo estudada. Existe uma correlação positiva entre as enzimas estudadas com o carbono orgânico total dos solos. Já para as frações areia, silte e argila a atividade enzimática foi correlacionada positivamente para a fração areia e negativamente para as frações de silte e argila. Quando avaliada a abundância de bactérias, por meio de quantificação do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA, as classes de solo Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico e Latossolo Vermelho Ácrico típico mostraram maior abundância. Já para a abundância de sequências do gene que codifica a região intergênica ITS do 18S do rRNA fúngico, os valores foram maiores no Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico. Quando as amostras de solos são analisadas em relação ao uso do solo ao longo do tempo, os resultados da análise de T-RFLP mostram que houveram mudanças nas comunidades bacterianas (gene *rrs* 16S rRNA) ao longo das três épocas estudadas. A análise de sequenciamento dos diferentes solos mostrou a ocorrência de quatorze filos bacterianos (gene *rrs* 16S rRNA), sendo o filo Proteobacteria o de maior abundância relativa em todas as classes de solos. Foram encontrados onze filos fúngicos, onde representantes de Ascomycota e Basidiomycota estavam presentes em todas as classes de solos estudadas. Os resultados mostram que as classes de solos têm características intrínsecas que possibilitam a composição particular e a resposta diferenciada da atividade microbiana dos solos. Dessa forma, a implementação de café arábica em diferentes classes de solos modula de forma distinta a comunidade microbiana do solo.

Palavras-chave: Bioindicadores do solo; Uso da terra; 16S rRNA; Textura do solo; Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal

ABSTRACT

Microbiological attributes in different soil classes with coffee deployment and millet cultivation

The implantation of coffee production requires changes in the characteristics of the soil. However, little is known about how this process can promote changes in soil microbial communities. In this way, the objective was to evaluate the changes in the structure and activity of microbial communities found in different classes of soils present in an area of implantation of a coffee plantation. The work was carried out in an experimental area of approximately 220 ha, in Patrocínio/MG, where 4 soil classes occur. In this area 74 sampling points were allocated, the samples were collected at depth 0 to 10 cm, in three periods throughout the implementation of the coffee plantation (September/2016, January/2017 and July/2017). For these samples, enzymatic activities of arylsulfatase and β -glucosidase, bacterial community structure by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), and quantification of fungal and bacterial communities by quantitative PCR (qPCR) were analyzed. The results show spatial variation in the enzymatic activity values for arylsulfatase over time (September/2016 from 12 to 131 $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1}\text{ soil ha}^{-1}$, January/2017 from 29 to 114 $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1}\text{ soil ha}^{-1}$ and July/2017 12 to 182 $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1}\text{ soil ha}^{-1}$) and also variation of these values according to the studied soil class. The β -glucosidase presented different behavior for each soil class studied. There is a positive correlation between the studied enzymes and the total organic carbon of the soils. As for the sand, silt and clay fractions, the enzymatic activity was positively correlated to the sand fraction and negatively correlated to the silt and clay fractions. When bacterial abundance was evaluated by quantifying the *rrs* gene that encodes the 16S rRNA, the typical Acric Red-Yellow Latosol and typical Acric Red Latosol showed greater abundance. As for the abundance of gene sequences encoding the 18S ITS intergenic region of the fungal rRNA, the values were higher in the Latossolic Concretionary Plinthosol. When soil samples are analyzed in relation to land use over time, the results of the T-RFLP analysis show that there were changes in bacterial communities (gene *rrs* 16S rRNA) over the three periods studied. The sequencing analysis of the different soils showed the occurrence of fourteen bacterial phyla (gene *rrs* 16S rRNA), with the Proteobacteria phylum with the highest relative abundance in all soil classes. Eleven fungal phyla were found, where representatives of Ascomycota and Basidiomycota were present in all studied soil classes. The results show that the soil classes have intrinsic characteristics that enable the particular composition and the differentiated response of the microbial activity of the soils. Thus, the implementation of Arabica coffee in different soil classes modulates the soil microbial community in a distinct way.

Keywords: Soil bioindicators; Land use; 16S rRNA; Soil texture; Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

3.1 Introdução

O solo é um recurso natural essencial para a produção agrícola, caracterizado por ser um sistema heterogêneo e dinâmico, o que permite a maximização da biodiversidade de microrganismos neste ambiente, seja esta taxonômica ou funcional (POSSLEY; WOODMANSEE; MASCHINSKI, 2008; DUNIWAY; BESTELMEYER; TUGEL, 2010).

Desta forma, sugere-se que a substituição de um cultivo por outro pode refletir na modificação de características químicas, físicas e biológicas do solo, sendo que as mudanças dos atributos biológicos do solo dependem de propriedades intrínsecas e de suas interações com o ecossistema (NIERO et al., 2010).

O sistema de uso do solo, bem como seu preparo e manejo, pode propiciar um impacto significativo sob sua comunidade microbiana, chegando a interferir na resiliência de diferentes processos que ali ocorrem (PRINGLE et al., 2016; KASCHUK et al., 2010).

Por meio do processo de exsudação radicular as plantas liberam elementos de carbono, promovendo uma interação entre microrganismos benéficos para seu desenvolvimento dentro do ecossistema. Essa comunicação permite a atuação de microrganismos rizosféricos na proteção de plantas, na disponibilidade de nutrientes, na defesa contra o estresse ambiental, dentre várias outras funções que proporcionam seu melhor desenvolvimento, além de participarem da degradação da matéria orgânica permitindo a manutenção da fertilidade do solo (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014).

A atividade e a composição microbiana do solo são importantes, pois que habitam esse ambiente, juntamente com a fauna edáfica, realizam processos importantes para a ciclagem de nutrientes e a manutenção do sistema solo. Pela alta sensibilidade as mudanças do manejo do solo, de cultivos e de seus tratos culturais, quando comparado aos parâmetros físicos e químicos, a atividade e a composição da comunidade microbiana vêm sendo utilizada para responder sobre alterações ocasionadas no solo (MELO; MARCHIORI, 1999; MASTO et al., 2009; CARDOSO et al., 2013). Mudanças na estrutura das comunidades microbianas podem levar a mudanças de funções importantes, como decomposição da matéria orgânica e degradação de poluentes (MACALADY et al., 1998).

Nesse sentido, a caracterização e a correlação entre os atributos biológicos, químicos e físicos de um solo durante o processo de substituição de cultivo pode identificar alternativas mais promissoras para o desenvolvimento de culturas, manejo do solo e qualidade ambiental. Desta maneira, a hipótese deste estudo é de que as diferentes classes de solos podem, durante o processo de implantação de café arábica, passar por mudanças distintas nas características biológicas do solo. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a mudança espacial e temporal da atividade microbiana pelos bioindicadores do solo e o estudo de sua estrutura, abundância e composição em diferentes classes de solos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da área

O estudo foi conduzido na DaTerra, uma propriedade localizada no município de Patrocínio (MG), com altitude média de 1.161 m, latitude 18°42'55.87"S e longitude de 46°54'29.80"O. O clima da região é caracterizado como inverno seco e um verão chuvoso (Aw) segundo a classificação climática proposta por Köppen, e segundo a classificação de macroclimas do Brasil, o município possui um clima subquente, de variedade Cwa, com médias térmicas variando de 19°C a 27°C, com pluviosidade média de 1500 mm/ano⁻¹ (SILVA; MALVINO, 2005).

Para realização do estudo foi selecionada uma área sob vegetação natural, com aproximadamente 220 ha. Toda a área teve um mapeamento pedológico realizado, sendo os solos classificados em Latossolo Vermelho ácrico típico, Latossolo Vermelho-Amarelo ácrico típico, Latossolo Amarelo ácrico petroplântico, Latossolo Amarelo ácrico típico e Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico (EMBRAPA, 2006) (Figura 1.1).

LAw1 - Latossolo Amarelo Ácrico petroplântico, textura argilosa cascalthenta/muito argilosa cascalthenta.

FFc1 - Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalthenta/muito argilosa cascalthenta – ausência da substituição de cultivo.

LAw2 - Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa – não utilizado.

LVAw1 - Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa.

LVw1 - Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa.

Figura 1.1. Apresentação das classes de solos encontradas na área experimental da Fazenda DaTerra, Patrocínio, MG.

No histórico de cobertura vegetal da área experimental da Fazenda DaTerra, inicialmente a área era ocupada por vegetação natural típica do Cerrado Mineiro, seguida de pastagem e assim mantida sem nenhum trato cultural e manejo do solo até julho/2016. No mês de agosto/2016 parte da área foi submetida a limpeza e preparo do solo (aração, gradagem, subsolagem, coveamento/sulcamento) para plantio de café arábica. Após a limpeza e preparo do solo da área total, o Latossolo Vermelho Ácrico típico e Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico foram submetidos ao plantio de café arábica das cultivares de café arábica: Catuaí Amarelo 62, Bourbon Amarelo, Catuaí Amarelo 2 SL e Arara, sendo irrigados por um pivô central. Já a área composta por Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico e por Latossolo Amarelo Ácrico petroplântico foram cultivadas com milho até novembro/2017.

3.2.2 Coleta de solos

As coletas para as análises dos atributos biológicos, químicos e textura dos solos (estas foram coletadas somente em janeiro/2017), foram realizadas numa malha de amostras georreferenciadas, dispostas em grade amostral (“*grid*”). Para a coleta de solos da área total, antes do plantio de café arábica, com o auxílio de um GPS, foram distribuídos e demarcados 74 pontos de coleta. As coletas foram realizadas na profundidade de 0,0 a 0,10 m, já para as coletas de solos após o plantio de café arábica as amostras foram coletadas nos mesmos pontos iniciais e na mesma profundidade, porém sendo realizadas próximas a projeção da copa do cafeeiro. O solo foi amostrado nos pontos de cruzamento de uma malha, com intervalos de 160 m na linha a 180 m nas entrelinhas entre um ponto e outro (Figura 1.2).

Figura 1.2. Representação da malha de pontos 1 a 74 utilizados para a amostragem dos diferentes solos ao longo do estudo.

3.2.3 Caracterização química e física dos solos

Para a caracterização dos atributos químicos e físicos dos solos, as amostras de cada ponto presente na grade amostral foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Químicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em julho/2017 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Caracterização química e granulométrica dos pontos amostrais, coletados na área experimental da Fazenda DaTerra, Patrocínio-MG.

PM	M.O. (g.dm ⁻³)	pH (CaCl ₂)	P (mg.dm ⁻³)	K	Ca	Mg	H+Al (mmolc.dm ⁻³)	SB	CTC	V (%)	S g kg ⁻¹	Ar	A	CL
P1	59,00	5,40	71	1,9	24	20	34	45,9	79,9	57	102	408	490	Arg
P2	45,00	5,40	22	<0,9	15	10	31	25,5	56,5	45	241	398	361	Arg
P3	74,00	5,20	58	8	33	16	31	57	88	65	173	385	442	Arg
P4	62,00	5,40	49	5,6	32	17	34	54,6	88,6	62	31	472	497	Arg
P5	45,00	4,80	33	3,2	24	10	38	37,2	75,2	49	84	491	425	Arg
P6	52,00	4,80	72	6,7	28	17	31	51,7	82,7	63	113	408	479	Arg
P7	43,00	4,90	32	<0,9	23	18	28	41,7	69,7	60	214	436	350	Arg
P8	43,00	4,90	28	5	16	10	31	31	62	50	120	438	442	Arg
P9	40,00	4,50	33	5,6	11	6	42	22,6	64,6	35	78	488	434	Arg
P10	44,00	4,80	33	3,1	11	9	52	23,1	75,1	31	136	525	339	Arg
P11	55,00	5,00	52	6	27	16	31	49	80	61	86	462	452	Arg
P12	50,00	5,00	32	4,3	20	11	42	35,3	77,3	46	115	539	345	Arg
P13	44,00	5,00	50	5,4	18	11	34	34,4	68,4	50	81	355	565	Arg
P14	41,00	4,60	30	1,5	9	7	47	17,5	64,5	27	183	511	305	Arg
P15	37,00	4,60	26	4,3	14	5	34	23,3	57,3	41	134	607	260	MA
P16	38,00	5,10	24	5,4	20	16	34	41,4	75,4	55	138	598	264	Arg
P17	52,00	5,00	25	3,9	21	10	47	34,9	81,9	43	244	533	223	Arg
P18	56,00	5,00	44	7,4	25	14	34	46,4	80,4	58	220	521	259	Arg
P19	58,00	5,30	38	13,5	28	16	31	57,5	88,5	65	310	474	216	Arg
P20	41,00	7,10	31	3,9	20	7	31	30,9	61,9	50	325	511	164	Arg
P21	39,00	6,10	42	6,4	19	7	31	32,4	63,4	51	265	582	152	Arg
P22	31,00	5,80	64	6,5	54	40	22	100,5	122,5	82	274	602	124	MA
P23	30,00	5,60	39	1,7	20	14	34	35,7	69,7	51	234	651	115	MA

P24	28,00	5,20	81	4	20	7	38	31	69	45	228	670	101	MA
P25	32,00	5,30	85	2,4	28	6	31	36,4	67,4	54	240	671	89	MA
P26	29,00	5,10	75	1,6	23	8	38	32,6	70,6	46	159	753	88	MA
P27	33,00	5,30	76	3	48	25	31	76	107	71	201	699	99	MA
P28	37,00	5,20	43	4,7	53	26	34	83,7	117,7	71	170	643	187	MA
P29	36,00	4,40	37	4,6	17	3	52	24,6	76,6	32	220	709	71	MA
P30	32,00	4,60	63	1,1	29	15	28	45,1	73,1	62	172	747	81	MA
P31	28,00	4,80	64	14,5	78	26	38	118,5	156,5	76	262	621	118	MA
P32	28,00	4,70	133	7	34	15	47	56	103	54	209	691	100	MA
P33	36,00	4,80	49	3,9	27	20	38	50,9	88,9	57	241	657	101	MA
P34	32,00	5,20	51	4,2	22	13	31	39,2	70,2	56	159	740	101	MA
P35	33,00	5,30	78	1,3	45	16	31	62,3	93,3	67	218	683	99	MA
P36	35,00	5,40	60	1,1	24	11	38	36,1	74,1	49	161	759	80	MA
P37	34,00	5,10	118	5,4	25	9	38	39,4	77,4	51	181	724	95	MA
P38	44,00	5,30	102	3,1	54	14	31	71,1	102,1	70	207	654	139	MA
P39	29,00	5,10	131	3	89	26	38	118	156	76	228	706	66	MA
P40	33,00	5,50	140	5,7	162	84	20	251,7	271,7	93	242	641	116	MA
P41	45,00	5,70	77	5	58	23	22	86	108	80	334	526	141	Arg
P42	31,00	5,80	86	1,1	56	24	22	81,1	103,1	79	273	619	108	MA
P43	34,00	5,30	45	2,2	64	41	34	107,2	141,2	76	257	636	107	MA
P44	34,00	5,20	72	2,3	28	12	34	42,3	76,3	55	191	718	91	MA
P45	31,00	5,20	102	1,2	51	13	38	65,2	103,2	63	215	692	93	MA
P46	49,00	5,20	69	3,5	24	8	47	35,5	82,5	43	193	690	117	MA
P47	35,00	5,10	131	3,7	30	11	34	44,7	78,7	57	198	677	125	MA
P48	40,00	5,30	60	5,2	43	25	22	73,2	95,2	77	256	658	87	MA
P49	37,00	7,40	66	1,9	85	23	22	109,9	131,9	83	248	610	142	MA
P50	41,00	7,10	55	2	57	24	25	83	108	77	263	624	112	MA
P51	36,00	6,80	79	1	49	20	22	70	92	76	219	659	122	MA
P52	37,00	5,80	52	4,6	54	20	42	78,6	120,6	65	174	720	106	MA
P53	44,00	5,70	67	3	33	10	31	46	77	60	214	672	114	MA
P54	30,00	4,60	67	1,4	15	6	47	22,4	69,4	32	185	731	84	MA
P55	39,00	5,30	95	2,6	26	8	34	36,6	70,6	52	154	703	143	MA
P56	46,00	5,60	56	1,3	56	34	20	91,3	111,3	82	284	491	226	Arg
P57	38,00	5,20	24	1,7	37	22	25	60,7	85,7	71	189	700	111	MA
P58	39,00	5,10	50	2	52	27	28	81	109	74	258	642	99	MA
P59	37,00	5,80	61	<0,9	39	20	22	59,7	81,7	73	187	690	123	MA
P60	36,00	5,30	46	1	19	7	34	27	61	44	189	703	108	MA
P61	35,00	4,50	237	1,5	39	46	47	86,5	133,5	65	193	682	125	MA
P62	33,00	5,00	66	2,4	48	20	34	70,4	104,4	67	200	666	134	MA
P63	36,00	5,50	66	1,4	44	18	34	63,4	97,4	65	231	582	186	Arg
P64	36,00	5,40	52	3,7	35	16	25	54,7	79,7	69	165	716	119	MA
P65	41,00	5,60	77	1,6	35	10	46,6	46,6	74,6	62	104	711	184	MA
P66	41,00	5,10	97	3,3	26	7	36,3	36,3	74,3	49	104	559	337	Arg
P67	41,00	5,00	166	3,9	26	6	35,9	35,9	73,9	49	241	632	128	MA
P68	45,00	5,30	166	8,3	53	22	83,3	83,3	103,3	81	205	708	87	MA
P69	33,00	4,30	147	5,8	28	11	44,8	44,8	96,8	46	151	486	363	Arg
P70	43,00	4,80	107	1,6	28	12	41,6	41,6	79,6	52	210	658	133	MA
P71	43,00	5,00	69	7,1	27	7	41,1	41,1	72,1	57	173	693	134	MA
P72	37,00	5,10	27	1	16	8	25	25	59	42	179	610	211	MA
P73	39,00	5,10	69	2,6	40	17	31	59,6	90,6	66	148	596	255	Arg
P74	34,00	5,40	27	4,3	41	17	20	62,3	82,3	76	169	444	386	Arg

Nota: PM=pontos amostrais; M.O.=matéria orgânica do solo; P=fósforo; K=potássio; Ca=cálcio; Mg=magnésio; H+Al= hidrogênio + alumínio; SB=soma de bases; CTC=capacidade de troca catiônica; V(%)= saturação de bases; S=silte; A=areia; Ar=argila; CL=classe textural; Arg=argilosa; MA=muito argilosa.

Com base nas amostras coletadas pode-se observar que as classes de solos estudadas se enquadram nas classes de argiloso (FFc1 e LAw1) a muito argiloso (LVAw1) e ainda existem pontos amostrados em que a classe de solo LVw1 compreendem pontos classificados entre solo argiloso a muito argiloso.

3.2.4 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Os bioindicadores microbiológicos do solo empregados foram as atividades das enzimas arilsulfatase, realizada em três períodos (setembro/2016, janeiro/2017 e julho/2017), e β -glucosidase, realizada somente em julho/2017. A metodologia empregada para as avaliações enzimáticas foi a descrita por Tabatabai (1994), utilizando a determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado pela arilsulfatase e pela β -glucosidase após incubação do solo com substrato específico (p-nitrofenol-sulfato e p-nitrofenol- β -D-glucopiranosídeo, respectivamente). Preparou-se uma curva padrão com as concentrações conhecidas de p-nitrofenol (0, 10, 20, 30, 40 e 50 g de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$) para determinar a quantidade de p-nitrofenol liberada, procedeu-se com a leitura das amostras com um espectrofotômetro a 410 nm de absorbância, sendo os valores de atividade da arilsulfatase e β -glucosidase expressos em mg p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo.

Para a avaliação dos bioindicadores foi realizado uma análise descritiva, sendo os valores para a atividade enzimática representados em mapas espaciais. Também foi realizado Testes de correlação de Pearson entre os atributos químicos e biológicos derivados das amostras de solo analisadas, entretanto este somente foi realizado para a terceira coleta de solos (julho/2017).

Com base nos resultados da análise química dos solos coletados em julho/2017, foi realizado uma análise de correlação de Pearson para os seguintes parâmetros: pH e carbono orgânico (CO), juntamente com a atividade enzimáticas da arilsulfatase e da β -glucosidase.

Com base na análise física dos solos coletados em julho/2017 foi realizado o teste de correlação de Pearson para a textura dos solos (areia, silte e argila) e os parâmetros biológicos.

3.2.5 Extração de DNA dos solos

A extração de DNA total do solo foi realizada com o kit comercial *PowewSoil*[®] DNA (Mobio Laboratories), seguindo as instruções do fabricante, utilizando 0,4 g de solo. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), com solução tampão TAE 1X (tris-acetato-EDTA) juntamente com o marcador de gene molecular *GeneRuler DNA Ladder 1 kb* (Invitrogen) e 2 μl do padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). A eletroforese foi realizada a $10\text{V}.\text{cm}^{-1}$, corada com solução de *GelRed*TM 1000x e foto documentada em luz ultravioleta pelo

ImageQuant TL software program (GE Healthcare Life Sciences), após a extração os DNAs foram armazenados a -20° para uso posterior.

3.2.6 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) e do gene fúngico ITS 18S rRNA de cada amostra de solo foi estimada por meio de reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o aparelho *Real-Time PCR System StepOne*, com o sistema SYBR Green I.

As reações para a comunidade bacteriana foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo: 10 µl de *SYBER® Green PCR MasterMix (Live Technologies™)*, 0,25 pmol de iniciadores P1 (5' -CCT ACG GGA GGC AGC AGC AG-3') e P2 (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993), 0,15 mg/mL⁻¹ Bovine Serum Albumin (Roche®) e 1 µl de DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante 30 s. Para verificar a especificidade da amplificação, as curvas de desnaturação foram realizadas com temperaturas crescentes, a partir de 60°C e chegando a 95°C.

Já para a comunidade fúngica as reações em tempo real foram realizadas em volume de 25 µl, contendo 12,5 µl do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Brasil) e os primers ITS1f (5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3') e 5.8 s (5' – CGC TGC GTT CTT CAT CG – 3') na concentração de 100 nM (FIERER et al., 2005). Os ciclos de amplificações foram iniciados com desnaturação a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 30 s; 53°C por 30 s e 72°C por 1 min, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 45 s (FIERER et al., 2005). Uma curva de desnaturação foi realizada ao final para todas as reações a uma temperatura entre 72° à 96°C para verificar a especificidade da amplificação.

As estimativas de quantificação de log do número de cópias do gene 16S rRNA por grama de solo foram calculados comparando os valores de Ct obtidos com os da curva padrão previamente construída com produtos de clones. Com isto, foi determinado a eficiência da quantificação, bem como o valor de regressão logarítmica das diluições utilizadas (R^2).

Para a análise do qPCR os resultados obtidos foram trabalhados por meio de uma análise descritiva, no qual os valores dos números de cópias dos genes bacterianos e fúngicos foram representados em mapas espaciais (semivariogramas).

3.2.7 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

Esta análise foi realizada para o estudo das comunidades de bactérias nas amostras das diferentes classes de solos para os três tempos de coleta (setembro/2016 janeiro e julho/2017).

A estrutura da comunidade bacteriana foi acessada por meio do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). A amplificação do gene alvo de bactérias, o *rrs* (16S rRNA), foi realizada usando os iniciadores 8-FM (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) (EDWARDS et al., 1989; SCHUTTE et al., 2009) e 926r (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3') (LANE et al., 1985; SCHUTTE et al., 2009).

Os ciclos das reações foram iniciados com a desnaturação a 95°C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e uma extensão final de 72°C por 10 min. O volume final das reações foi de 50 µL, contendo 6 µL de MgCl₂ (concentração final de Mg²⁺ de 3 mM), 0,2 µL (equivalente a 1U) de “Taq” polimerase, 5 µL do tampão livre de Mg²⁺ para “Taq” polimerase (100 mM Tris-Cl (pH 8,8), 500 mM KCl, 1% Triton-X-100) (Sinapse Inc, São Paulo, Brasil), 4 µL de “Deoxynucleoside Triphosphate” (dNTP) (0,2 mM de cada base nitrogenada), 0,1 µL de cada iniciador (0,01 mM) (8-FM e 926r, previamente mencionados), e 1 µL de DNA molde, completando com 33,6 µL de água ultrapura autoclavada. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

A qualidade das reações foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corrido em 90 V por 60 min em tampão de tris-acetato-EDTA (TAE 1x) utilizando 5 µl do produto de PCR corado com GelRed™ (0,5 µg mL⁻¹), visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados com adição de 200 µL de álcool isopropílico P.A (PM = 60,1) por amostra, seguido por incubação por 2 horas à -20°C e centrifugação a 4000 rpm por 90 min a 4 °C.

Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 250 µL de álcool etílico absoluto (70%) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras nas condições supracitadas. O sobrenadante foi descartado e as amostras centrifugadas invertidas até atingir a rotação de 250 rpm. Ressuspendeu-se as amostras com 25 µL de água ultrapura autoclavada e acondicionou-se em freezer a -20°C e a qualidade da purificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 2 % após um período de 8 horas de hidratação. O volume final das reações de digestão (clivagens) foi de 20 µL, contendo 10 µL do produto de PCR purificado (aproximadamente 100

ng), 2,0 µL do tampão da enzima (10X Buffer Tango), 0,5 µL da enzima Anza™ 59Hha I (5 U) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) completando com 7,5 µL de água ultrapura e mantidos em 37°C por 3 horas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

Logo após estes produtos foram precipitados adicionando para cada amostra, 2µL de EDTA 125 mM, 2 µL de acetado de sódio 3 M e 50 µL de álcool etílico absoluto P.A e deixado em repouso por 15 min seguido de centrifugação a 2128rpm por 30 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 70 µL de álcool etílico absoluto (70%) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras por 20 min a 2128 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas ao ar por 40 min. Logo após as amostras foram resuspendidas usando fomamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Life Technologies) com marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies) e analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Os resultados foram processados usando o software GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras.

Os resultados para o T-RFLP do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA), foram exportados de uma tabela da área de picos e os padrões agrupados usando análise de coordenadas principais (PCoA) no programa R 2.15.1 (Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing). Para analisar os dados foi realizado uma análise de PCoA (Análise de coordenadas principais) realizada com Bray – Curtis, essa análise a distância relativa de qualquer amostra é preservada entre os dados amostrados. Obteve-se também os valores para o Índice de Shannon H e de Riqueza com base nas OTUs encontradas.

3.2.8 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos

Para a caracterização das comunidades bacterianas presentes nos solos foi realizada o sequenciamento da região V4 do gene ribossomal 16S rRNA através da plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina, USA). Foi realizada a amplificação e sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA de Bacteria. Para isto foi utilizando os oligonucleotídeos 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (CAPORASO et al., 2011; PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016) seguindo as condições de amplificação do protocolo de sequenciamento do gene 16S rRNA de Bacteria proposto pelo Earth Microbiome (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>).

Além disso, foi realizado o sequenciamento das comunidades fúngicas através da amplificação da região intergênica do DNA ribossomal (ITS) utilizando os oligonucleotídeos ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') seguindo as condições de amplificação do protocolo de sequenciamento ITS descrito pelo Earth Microbiome (<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/its/>) (WHITE et al., 1990; WALTERS et al., 2016). Os produtos das amplificações foram purificados utilizando o kit comercial Ultra Clean PCR Clean Up (Qiagen, Hilden, Germany), agrupados em concentrações equimolares e posteriormente enviadas para o Laboratório Multiusuários Centralizados (ESALQ/USP) para serem sequenciados na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc, San Diego, USA), a ser realizado por serviço terceirizado.

As sequências obtidas foram processadas utilizando QIIME2 (BOLYEN et al., 2018) e UPARSE (EDGAR, 2013) seguindo as recomendações do Brazilian Microbiome Project (<https://www.brmicrobiome.org>) (PYLRO et al., 2014). Resumidamente, *paired-end* sequências foram truncadas em 240 pb (*forward*) e 160 pb (*reverse*) e sequências menores que o tamanho mínimo foram descartadas. Para filtragem das sequências com baixa qualidade, foram retiradas todas sequências que apresentarem o número máximo de erros esperados (maxEE) igual ou maior que 2 e após o truncamento, sequências com mais de 0 Ns também foram descartadas.

As sequências pré-filtradas foram desreplicadas e *singletons* foram removidos utilizando o USEARCH 7.0. Em seguida, as sequências foram agrupadas em OTUs com valor de similaridade maior ou igual 97% de acordo com UPARSE pipeline. Após o agrupamento, as sequências foram alinhadas e taxonomicamente classificadas com a ajuda dos bancos de dados SILVA (QUAST et al., 2013) para bactérias e UNITE (ABARENKOV et al., 2010) para fungos. Após a geração das matrizes de abundância de bactérias e fungos foram calculados os índices de diversidade e riqueza das amostras no programa PAST3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Para todas as matrizes foram verificadas a distribuição dos dados de maneira a garantir que seja escolhido o modelo matemático mais adequado para as análises.

Em seguida, foram verificados os Índices de Shannon-Wiener (H') e de Chao 1 para o número de espécies observadas para os genes bacteriano *rrs* (16S rRNA) e gene que codifica a região intergênica ITS do 18S do rRNA fúngico para as amostras de solos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Verifica-se uma variação espacial nos valores de atividade biológica obtidos nos diferentes solos. Após o preparo do solo para cultivo (setembro/2016), os resultados da atividade enzimática da arilsulfatase mostram valores máximos de 131 e valores mínimos de até 29 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ (Figura 1.3).

Figura 1.3. Atividade enzimática da arilsulfatase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$), avaliada em setembro/2016, em amostras de diferentes classes de solos: LAw1 (Latossolo Amarelo Ácrico petroplântico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVAw1 (Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); e, LVw1 (Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro, coletadas na profundidade de 0 a 10 cm.

Nessa primeira época de avaliação os maiores valores da atividade enzimática da arilsulfatase foram encontrados nos solos de classe LVAw1 e LVw1 (valores entre 114-131 e 97-114 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ respectivamente). A menor atividade enzimática da

arilsulfatase foi encontrada nas classes de solos LAw1 e FFc1 (valores entre 12 a 46 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$).

Para a segunda avaliação e a terceira época de avaliação, deve-se levar em consideração de que o plantio de café arábica ocorreu somente nas classes de solos: LVAw1 e LVw1. Enquanto as áreas de classes de solos LAw1 e FFc1 foram cultivados com milho (Figura 1.4). Assim, dentro da segunda avaliação as classes LVAw1 e LVw1 permanecem com maiores valores da atividade da arilsulfatase (valores entre 63-80 até 97-114 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$), enquanto que as classes de solos LAw1 e FFc1 permanecem com os menores valores para a atividade enzimática da arilsulfatase (valores entre 29 a 46 $\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$).

Figura 1.4. Atividade enzimática da arilsulfatase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$), avaliada em janeiro/2017, em amostras de diferentes classes de solos: LAw1 (Latossolo Amarelo Ácrico petroplântico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVAw1 (Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVw1 (Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro, coletadas na profundidade de 0 a 10 cm. Sendo que nas classes de solos LAw2, LVAw1 e LVw1 houve o cultivo de café arábica e nas classes de solos LAw1 e FFc1 cultivo com gramínea.

Resultados contrastantes a estes foram obtidos para a atividade enzimática da arilsulfatase realizada em julho/2017. Os resultados mostram uma transição da atividade enzimática dentro das classes de solos independentemente dos cultivos, no qual as classes de solo LAw1 e FFc1 apresentaram maior atividade enzimática, resultado inverso ao encontrado para as demais classes de solos (Figura 1.5).

Figura 1.5. Atividade enzimática da arilsulfatase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$), avaliada em julho/2017, em amostras de diferentes classes de solos: LAw1 (Latosolo Amarelo Ácrico petroplíntico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latosolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVAw1 (Latosolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVw1 (Latosolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro, coletadas na profundidade de 0 a 10 cm. Sendo que nas classes de solos LVAw1 e LVw1 houve o cultivo de café arábica e nas classes de solos LAw1 e FFc1 cultivo com gramínea.

A atividade enzimática da β -glucosidase foi realizada somente na terceira coleta em julho/2017, sendo possível, especialmente, encontrar os maiores valores da atividade enzimática no Plintossolo Petríco (Figura 06), quando comparado com o Latossolo Vermelho ($33 \text{ a } 285 \text{ g } p\text{-nitrofenol.g}^{-1} \text{ solo hora}^{-1}$) (Figura 1.6).

Figura 1.6. Atividade enzimática da β -glucosidase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$), avaliada em julho/2017, em amostras de diferentes classes de solos: LAw1 (Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVAw1 (Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVw1 (Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro, coletadas na profundidade de 0 a 10 cm. Sendo que nas classes de solos LVAw1 e LVw1 houve o cultivo de café arábica e nas classes de solos LAw1 e FFc1 cultivo com gramínea.

Na análise de correlação foi observado que as duas enzimas apresentam correlação entre si, além de uma correlação positiva com o CO (Tabela 1.2). Porém, as mesmas não mostraram correlação com os valores de pH das amostras analisadas.

A atividade da β -glucosidase apresentou correlação com o teor de matéria orgânica do solo (Figura 1.6). A área constituída pelo FFc1 e pelo LAw1 apresentaram maiores teores de matéria orgânica do solo (valores entre 39 e 59 g.dm^3) quando comparado as demais classes de solo LVw1 e LVAw1 (valores entre 28 a 49 g.dm^3).

Tabela 1.2. Teste de correlação de Pearson entre os atributos químicos e biológicos derivados das amostras de solo analisadas somente para a terceira coleta de solos (julho/2017).

Variáveis	Arilsulfatase	β -glucosidase	pH	CO
Arilsulfatase	1,00			
β -glucosidase	0,74*	1,00		
pH	0,12 ^{ns}	0,08 ^{ns}	1,00	
CO	0,79*	0,70*	0,00	1,00

Nota: *Significativo a 0,1% de probabilidade; ^{ns}Não significativo; pH= potencial hidrogeniônico; CO= carbono orgânico do solo.

Os resultados indicam correlação negativa para o silte e argila e as atividades enzimáticas. Resultado oposto para a fração areia, que apresentou correlação positiva para as duas atividades enzimáticas dos solos estudados (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Teste de correlação de Pearson, entre os atributos físicos e microbiológicos do solo.

Variáveis	Silte	Argila	Areia	Arilsulfatase	β -glucosidase
Silte	1.00				
Argila	0.20*	1.00			
Areia	-0.62**	-0.89**	1.00		
Arilsulfatase	-0.13 ^{ns}	-0.54**	0.49**	1.00	
β -glucosidase	-0.22*	-0.45 ^{ns}	0.46**	0.74**	1.00

Nota: *Significativo a 10% de probabilidade; **Significativo 0,1% de probabilidade; ^{ns}Não significativo.

3.3.2 Avaliação de abundância microbiana

A caracterização da abundância das comunidades de bactérias (16S rRNA) e fungos (gene ITS do 18S rRNA) dos solos coletados em setembro/2016 foi realizada com o intuito de fornecer informações iniciais da área. Assim, os resultados mostram que para a abundância da comunidade de bactéria os números de cópias do gene 16S rRNA bacteriano variou de $9,73 \times 10^9$ a $11,21 \times 10^{11}$ cópias / g de solo. Em relação as diferenciações entre os solos, a abundância de bactérias foi maior no LVw1 quando comparado com o FFc1(Figura 1.7).

Escala para número de cópias do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA bacteriano por grama de solo:

Figura 1.7. Distribuição espacial da abundância de sequência do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA bacteriano (log do número de cópias do gene 16S g solo⁻¹) encontradas nas cinco diferentes classes de solos: LAw1 (Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LVAw1 (Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVw1 (Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro. Patrocínio, MG. Coleta de setembro de 2016.

Percebe-se que a abundância de bactérias foi maior no LVAw1 e no LVw1 quando comparado com o FFc1 e ao LAw1, resultado inverso ao obtido para a comunidade de fungos, sendo que o Plintossolo mostrou maior abundância de fungos.

Já para a quantificação da abundância de sequências do gene que codifica a região intergênica ITS do 18S do rRNA fúngico, entre as cinco diferentes classes de solos, houve uma variação de $1,5 \times 10^6$ a $8,5 \times 10^7$ cópias g⁻¹ de solo (Figura 1.8). Em relação as diferenciações entre os solos, a classe de solo FFc1 apresentou maiores valores de genes fúngicos (ITS do 18S do rRNA) ($2,6 \times 10^7$ a $8,5 \times 10^7$ cópias g⁻¹ de solo) (Figura 1.8).

Escala para número de cópias do gene que codifica a região intergênica ITS do 18s rRNA fúngico:

Figura 1.8. Distribuição espacial da abundância de sequência da região intergênica ITS do 18s do rRNA fúngico ($\log$ do número de cópias do gene ITS rRNA g solo⁻¹) entre as cinco diferentes classes de solos: LAw1 (Latossolo Amarelo Ácrico petroplântico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); FFc1 (Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico, textura argilosa cascalhenta/muito argilosa cascalhenta); LAw2 (Latossolo Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVAw1 (Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico, textura muito argilosa); LVw1 (Latossolo Vermelho Ácrico típico, textura argilosa) no Cerrado Mineiro. Patrocínio, MG. Coleta de setembro de 2016.

3.3.3 Avaliação da estrutura da comunidade por TRFLP

A dinâmica da estrutura da comunidade bacteriana (16S rRNA) nas diferentes classes de solos e ao longo das alterações no manejo foi avaliada pela metodologia de T-RFLP, considerando três amostragens de solos (setembro/2016, janeiro/2017 e julho/2017).

Figura 1.9. Análise de coordenadas principais (PCoA) das estruturas genéticas do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA), obtidas nos diferentes tempos. T1= setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); T2= janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e T3= julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica mais a área com milho).

Ainda na comparação por períodos de amostragem, quando as amostras de solos são analisadas em relação ao uso do solo ao longo do tempo, percebe-se que existe diferença para o Índice de riqueza e o Índice de Shannon H. O índice de riqueza ($Pr > F_c = 0,00$ e coeficiente de variação de 12,97%) mostra que a área inicial (setembro/2016) tem menor riqueza para o gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) (137,12b) quando comparada aos outros dois momentos de amostragem (324,62a e 303,00a para janeiro e julho/2017, respectivamente) (Figura 1.10).

Figura 1.10. Riqueza do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) de amostras de solos ao longo da implantação de café arábica, submetidas a três diferentes momentos de coleta: T1= setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); T2= janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e T3= julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica mais cultivo de milho). Cada barra dentro dos tempos (T1, T2 e T3) representa uma classe de solo avaliada. FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAw1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico.

Resultados estes semelhantes para o Índice de Shannon H, no qual o menor valor para este índice foi obtido nos solos manejados em setembro/2016 (4,25b) e os maiores valores para os outros dois solos manejos em janeiro e julho/2017 (5,06a e 4,98a) (Figura 1.11).

Figura 1.11. Índice de Shannon H para o gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) de amostras de solos ao longo da implantação de café arábica, submetidas a três diferentes momentos de coleta: T1= setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); T2= janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e T3= julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica mais cultivo de milho). Cada barra dentro dos tempos (T1, T2 e T3) representa uma classe de solo avaliada. FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAw1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico.

Uma outra forma de observar os dados, é buscar por diferenças entre os solos dentro de cada um dos momentos de amostragem. No entanto, os dados de T-RFLP não revelaram diferenciações entre as comunidades bacterianas presentes nos diferentes solos, nos três momentos de avaliação (Figura 1.12BC).

Figura 1.12. Análise de coordenadas principais (PCoA) das estruturas genéticas do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) em separadas, obtidas dos diferentes tempos de coletas de solo. Amostras em separadas: A= coleta de setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); B= coleta de janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e, C= coleta de julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica e área cultivada com milho). FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAw1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico.

Quando avaliado em separado os Índices de Riqueza (setembro/2016, janeiro/2017 e julho/2017), os dados indicam que não há diferença significativa para estas variáveis, mensuradas com base no estudo do gene bacteriano *rrs* 16S rRNA dentro das classes de solos. Porém existem variações para cada coleta quando visualizado as classes de solos (Figura 1.13). O Índice de Riqueza mostra variações em sua escala, possibilitando descrever de que - apesar

de que não houve diferença significativa entre as classes de solos, o plantio de café arábica influenciou o aumento do Índice de Riqueza do gene bacteriano *rrs* 16S rRNA.

O Índice de Riqueza para a classe de solo FFc1 esteve abaixo das demais classes de solos, lembrando de que este solo foi cultivado com milho em julho/2017 (Figura 1.13).

Figura 1.13. Índice de Riqueza do gene bacteriano *rrs* 16S rRNA encontrado nos diferentes tempos de coletas de solo. Amostras em separadas: T1= coleta de setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); T2= coleta de janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e, T3= coleta de julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica e milho). FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAw1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico. Cada barra dentro dos tempos (T1, T2 e T3) representa uma classe de solo avaliada.

Quando avaliado o Índice de Shannon H do gene bacteriano *rrs* 16S rRNA em tempos de coleta separados, a classe de solo FFc1 mostra maior índice (setembro/2016) não diferindo apenas da classe LVw1, lembrando de que nesta época de coleta de solos houve o manejo para implantação de cultivos, a área ainda não estava sendo cultivada (Figura 1.14).

Figura 1.14. Índice de Shannon H do gene bacteriano *rrs* 16S rRNA encontrado nos diferentes tempos de coletas de solo. Amostras em separadas: T1= coleta de setembro/2016 (área manejada para plantio de café arábica); T2= coleta de janeiro/2017 (área com quatro meses após o plantio de café arábica); e, T3= coleta de julho/2017 (área com dez meses após o plantio de café arábica). FFC1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAW1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplíntico; LVAW1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVW1= Latossolo Vermelho Ácrico típico.

Já em janeiro/2017, após quatro meses de plantio de café arábica (nas classes de solos LVW1 e LVAW1) e de milho (nas classes de solos FFC1 e LAW1), não houve diferença entre as diferentes classes de solos (Figura 1.14.)

Na terceira época avaliada (julho/2017) os resultados do Índice de Shannon H para o gene bacteriano *rrs* 16S rRNA, mostram que a classe de solo LVW1 após dez meses de cultivo com café arábica apresentou maior valor para este índice, diferindo apenas do FFC1, sendo que nesta área o solo estava sendo cultivado com milho e não com café arábica (Figura 1.14).

3.3.4 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos

Considerando que a diferenciação entre os solos da primeira coleta, um estudo aprofundado destas amostras foi realizado por meio do sequenciamento do DNA de bactérias e fungos. No total, foram analisadas quatro amostras de cada classe de solo (LVW1, LVAW1, FFC1 e LAW1), tanto para bactérias como para fungos. Um total de 7.000 sequências de bactérias e 35.000 sequências de fungos por amostra foram analisadas.

Para o índice de diversidade de Shannon-Wiener de bactérias (16S rRNA) e fungos (ITS do 18S), os resultados indicam que os valores são similares entre as classes de solos estudadas (Tabela 1.4). Já quando avaliado o índice de riqueza de espécies por meio do Índice de Chao 1

(índice não-paramétrico), os resultados mostram que o LAw1 teve um número maior quando comparado com as demais classes de solo, tanto para bactérias como para fungos (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Valores dos índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e de Chao 1 para o número de espécies observadas para os genes bacteriano *rrs* (16S rRNA) e gene que codifica a região intergênica ITS do 18S do rRNA fúngico em solos do Cerrado Mineiro.

Índices	Solos			
	FFc1	LVw1	LVAw1	LAw1
Bactérias (16S rRNA)				
H'	5,95 ± 0,05	6,05 ± 0,05	6,005 ± 0,09	6,05 ± 0,15
Chao 1	192,7 ± 5,7	194,3 ± 2,6	194,5 ± 9,6	204,7 ± 6,6
Fungos (ITS do 18S do rRNA)				
H'	6,49 ± 0,66	6,90 ± 0,47	6,61 ± 0,34	6,67 ± 0,20
Chao 1	639,7 ± 71,7	675,9 ± 34,2	615,3 ± 34,7	706,0 ± 8,2

Nota: FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LAw1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico.

Quando avaliado o gene que codifica a região intergênica ITS fúngico dentro Índices de diversidade de Shannon-Wiener (H'), a classe de solo LVw1 mostrou maior diversidade para a comunidade fúngica, já quando verificado o índice de riqueza de espécies por meio do Índice de Chao 1, a classe de solo LAw1 apresentou um valor superior as demais classes de solos. Percebe-se que a classes de solo LAw1 apresentou o mesmo comportamento dentro do Índice de Chao 1, indicando valores maiores tanto dentro do material avaliado para genes bacteriano *rrs* (16S rRNA) como o da região intergênica ITS do 18S do rRNA fúngico (Tabela 1.4).

Com base nestes dados de sequenciamento de DNA, para bactérias foram encontrados 14 filos bacterianos, merecendo destaque para aqueles com a abundância relativa de OTU's acima de 2%. Foram encontrados os seguintes filos: Acidobacteria (5,8%), Actinobacteria (36,2%), Chloroflexi (10,3%), Gemmatimonadetes (3,4%), Planctomycetes (2%), Proteobacteria (40,2%) e Verrucomicrobia (2,0%), juntas somam um total de 99,9% de sequencias analisadas (Figura 1.15), os quais ocorreram em frequências similares dos diferentes solos.

Figura 1.15. Médias da abundância relativa dos principais filos encontrados nas diferentes classes de solos, a partir do o sequenciamento da região V4 do gene ribossomal 16S rRNA. Os dados são resultados da classificação de sequências representativas de cada uma das OTU obtidas (97% similaridade) com a distribuição de 7000 sequencias por amostras.

Representantes do filo Proteobacteria apresentaram a abundância relativa mais elevada em todas as diferentes classes de solos, seguido do filo Actinobacteria.

Quando verificado os gêneros com abundância relativa acima de 1%, foram encontrados 15 gêneros, sendo estes: *Mycobacterium* (2,7%), *Acidothermus* (1,7%), *Blastococcus* (3,2%), *Pseudarthrobacter* (3,4%), *Pseudonocardia* (1,4%), *Saccharopolyspora* (1,5%), *Streptomyces* (3,1%), *Conexibacter* (3,4%), *3G30a-KF-32* (1,9%), *Microvirga* (1,3%), *Bradyrhizobium* (4,9%), *Rhodoplanes* (2,1%), *Sphingomonas* (3,8%), *Massilia* (1,8%) e *Candidatus Xiphi* (1,1%), no qual juntas somam 37,3% de abundância relativa de OTU's totais.

O gênero *Bradyrhizobium*, apresentou maiores valores de abundâncias para duas classes de solos LAw1 e LVAw1 (11,52 e 12,2%, respectivamente), para a classe FFc1 o gênero com maior abundância relativa de OTU's foi o *Conexibacter* (15,23%) e para a classe LVw1 o gênero *Blastococcus* (16,74%).

Dentro das classes de solos FFc1, LVAw1 e LVw1 os valores para as menores abundâncias relativas de OTU's de bactérias foram encontrados no gênero *Saccharopolyspora* (1,38, 0,36 e 0,11% respectivamente). Já dentro da classe LAw1 o gênero *Acidothermus* (1,69%) apresentou menor valor de abundância relativa (Figura 1.16).

Figura 1.16. Abundância relativa de sequências baseadas no gênero de bactérias encontrados em diferentes classes de solos, sendo: FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAW1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico. Sequenciamento realizado da região V4-V5 do gene ribossomal 16S rRNA.

A abundância relativa para os principais filos provenientes do sequenciamento do gene ITS do 18S do rRNA fúngico identificou um total de 11 filos identificados, sendo destacados os filos com ao menos 2% de abundância relativa, sendo estes os filos *Ascomycota* (40,7%), *Basidiomycota* (25,3%) e *Mortierellomycota* (7,5%), os quais juntos correspondem a 73,5% de abundância relativa total (Figura 1.17).

Figura 1.17. Médias da abundância relativa dos principais filos encontrados nas diferentes classes de solos, a partir do o sequenciamento do gene ITS rRNA fúngico. Os dados são resultados da classificação de sequências representativas de cada uma das OTU obtidas (97% similaridade) com a distribuição de 7000 sequencias por amostras.

Em todas as classes de solos foram encontrados valores maiores para os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Dentro da classe FFc1 o filo *Ascomycota* (28,4%) apresentou maiores valores para média de abundância relativa de OTU's, seguido em ordem creste pelo filo *Basidiomycota* (22,35%) e *Mortierellomycota* (8,65%).

Nas amostras avaliadas foram encontrados dez filos fúngicos, porém quando considerados a abundância relativa igual ou maior do que 1%, encontramos apenas: *Ascomycota* (40,7%), *Basidiomycota* (25,3%), *Chytridiomycota* (1%) e *Mortierellomycota* (7,5%), somando um total de 74,50% das sequências (Figura 1.17).

Os resultados para abundância para os gêneros fúngicos mostram que cada classe de solo apresentou uma abundância relativa específica. Para a classe de solo FFc1, dois gêneros fúngicos apresentaram os mesmos valores de abundância (14,28%), sendo estes o gênero *Scytalidium* e *Clitopilus*. Nestes solos não foram encontrados fungos do gênero *Penicillium* e *Fusarium*. Para o solo LAw1 o gênero de maior abundância foi *Clonostachys* (20,31%). Fungos do gênero *Glomus* não estavam presentes no solo LAw1, assim como os gênero *Metarhizium* para os solos LVAw1 e LVw1. Para o solo LVAw1 a maior abundância foi encontrada com o gênero *Penicillium* (21,25%) e para o solo LVw1 fungos do gênero *Fusarium* (15%). Os menores valores de abundância foram encontrados no gênero *Phoma* para os solos FFc1 e

LAW1 (0,64 e 0,78; % respectivamente), *Trichoderma* no solo LVAw1 (0,62%) e *Acremonium* (1%) para o solo LVw1 (Figura 1.18).

Figura 1.18. Abundância relativa de sequências baseadas no gênero ITS de fungos encontrados em diferentes classes de solos, sendo: FFc1= Plintossolo Pétrico Concrecionário latossólico; LAW1= Latossolo Amarelo Ácrico petroplúntico; LVAw1= Latossolo Vermelho-Amarelo Ácrico típico; e, LVw1= Latossolo Vermelho Ácrico típico. Sequenciamento realizado do gene ITS rRNA.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Considerando que a análise de mapeamento biológico proporciona a visualização da distribuição espacial dos dados de bioindicadores do solo, houve uma mudança no ranking de atividades para a atividade enzimática da arilsulfatase durante as avaliações (setembro/2016, janeiro e julho/2017), onde a mudança dos valores enzimáticos ao longo do tempo podem estar relacionados com a implementação da lavoura de café arábica nas classes de solos LVAw1 e LVw1 e o cultivo de milho nas classes de solos FFc1 e LAW1 (janeiro e julho/2017) (Figura 1.3; 1.4 e 1.5).

Os altos valores da arilsulfatase estão relacionados a matéria orgânica do solo (o reservatório principal de ésteres de sulfato) e também a quantidade de alguns nutrientes no solo

(como a presença de altos teores de fosfato (H_2PO_4^-)), no qual em sua solução podem aumentar esta atividade desta enzima (TABATABAI, 1994; BALOTA; CHAVES, 2010). Pode-se explicar este evento pela competição do H_2PO_4^- pelo mesmo sítio de adsorção nos coloides do solo com sulfato (SO_4^-), sendo que o H_2PO_4^- é adsorvido com maior facilidade devido a preferência dos coloides do solo, causando deficiência de SO_4^{2-} (sulfatos) disponível e consequentemente estimulando a atividade enzimática da arilsulfatase no solo (BALOTA; CHAVES, 2010).

De acordo com os dados da coleta de julho/2017, os resultados mostram que a maior quantidade de matéria orgânica do solo proporcionou maior atividade da β -glucosidase nas classes de solos do FFc1 e LAw1, no qual existe uma correlação positiva entre o carbono orgânico do solo e atividade enzimática da β -glucosidase nos solos (Tabela 1.2). A atividade da β -glucosidase nos ecossistemas do solo depende principalmente dos níveis de carbono orgânico, tipo de solo, composição do solo e diversidade e função da comunidade microbiana (DAS, VARMA, 2010). A maior atividade enzimática da β -glucosidase em um Latossolo Vermelho distrófico foi obtida com o cultivo de *U. brizantha*, milho e crambe, estes solos apresentaram os maiores valores de β -glucosidase quando comparado a outras plantas (nabo forrageiro, sorgo, *U. ruziziensis*) não diferindo entre si (143,25, 143,18 e 142,78 μg p-nitrofenol $\text{kg solo}^{-1}\text{h}^{-1}$ respectivamente) (SIMON et al., 2019). A alta atividade enzimática da β -glucosidase dos solos FFc1 e LAw1 mostra que um manejo com plantas de cobertura pode melhorar a atividade microbiana dos solos e, consequentemente, favorecer a implantação de uma nova cultura.

Os níveis das atividades das enzimas em sistemas de solo variam em quantidades, principalmente devido ao fato de que cada tipo de solo tem diferentes quantidades de conteúdo de matéria orgânica, composição, atividade de seus organismos vivos e intensidade dos processos biológicos. O aumento da atividade enzimática tem sido relacionado a um efeito combinado do material orgânico e dos exsudatos da raiz da planta (DENG; TABATABAI, 1997; SAKURAI et al., 2008).

Avaliando a atividade biológica em diferentes cultivares de milho Ndour et al. (2021) descreveram que associados a rizosfera desta cultura existe uma diversidade de fungos e bactérias que exercem diferentes funções, os autores ainda descrevem que no milho o processo de agregação do solo aderente à raiz é muito complexo e pode envolver outros mecanismos como a arquitetura da raiz, comprimento e peso das raízes e a composição dos exsudatos radiculares. Esses resultados indicam que o material vegetal cultivado e aportado

sobre o solo tem grande influência na comunidade microbiana, bem como na atividade enzimática do solo.

Deve-se considerar que nas classes de solos FFc1 e LAw1 o material vegetal aportado sobre o solo tem grande influência na atividade biológica do solo. O aumento do aporte de resíduos vegetais no solo aumenta a atividade biológica, o aporte constante de material orgânico no solo aumenta o processo de ciclagem de nutrientes, a estrutura e agregação, influenciando outras características químico-físicas, como por exemplo na retenção de água nos solos (MENDES et al., 2018).

Os agregados do solo protegem de forma física a matéria orgânica do solo, formando uma barreira entre microrganismos e suas enzimas microbianas, limitando a acessibilidade dos decompositores e enzimas aos substratos orgânicos (PULLEMAN; MARINISSEN, 2004; PLAZA et. al., 2013). Além disto, os mecanismos de estabilização química referem-se à associação íntima da matéria orgânica do solo com partículas minerais, reduzindo a capacidade de degradação de decompositores e enzimas, desta forma partículas de silte e argila podem adsorver (fixar) exoenzimas responsáveis pela clivagem de estruturas orgânicas e consequentemente interferindo nas interações microbianas do solo (SIX et al., 2002; PULLEMAN; MARINISSEN, 2004).

A matéria orgânica do solo pode ser fisicamente estabilizada ou protegida da decomposição por meio de microagregação, associação íntima com partículas de argila, e ainda pode ser bioquimicamente estabilizada através da formação de compostos da matéria orgânica do solo recalcitrantes (GUDEA et al., 2012). O aumento da matéria orgânica do solo aumenta sua atividade biológica, podendo afetar sua estabilização e a dinâmica do carbono do solo (SIX et al., 2006), assim pode-se sugerir que em solos argilosos o incremento de práticas de manejo do solo que proporcionem o aumento de sua matéria orgânica aumenta a atividade microbiana, melhorando sua fertilidade ao longo do tempo.

Segundo Sarkar et al. (1989), a adsorção de enzimas extracelulares como a arilsulfatase e a β -glucosidase às partículas de argila é um mecanismo de estabilização e proteção contra proteases existentes na solução do solo. Este fato pode garantir a maior atividade destas enzimas neste tipo de solo, bem como estar relacionado a granulometria do mesmo. Para Burns et al. (2013) enzimas extracelulares presentes no solo, podem ficar estabilizadas por meio da associação a fração de argila e ácido húmico podendo causar a diminuição da atividade enzimática.

Com base nos resultados da análise química dos solos coletados em julho/2017, foi realizado uma análise de correlação de Pearson para os seguintes parâmetros: pH e carbono

orgânico (CO), juntamente com a atividade enzimáticas da arilsulfatase e da β -glucosidase. Na análise de correlação foi observado que as duas enzimas apresentam correlação entre si, além de uma correlação positiva com o CO (Tabela 1.2). Porém, as mesmas não mostraram correlação com os valores de pH das amostras analisadas.

Os resultados indicam que a mudança do uso da terra promove alterações na atividade biológica das diferentes classes de solos. Por meio da atividade biológica dos solos avaliadas pode-se confirmar de que o solo é um ambiente dinâmico e heterogêneo, no qual seu manejo e a introdução de plantas no sistema modula a atividade enzimática ao longo do tempo. A heterogeneidade dos solos nesse sistema está relacionada as suas diferentes características, no qual cada classe de solos avaliada possui características específicas, como pH, temperatura, quantidade de oxigênio, fontes de energia, granulometria, dentre outros fatores que modulam a comunidade microbiana.

3.4.2 Avaliação de abundância microbiana

A diferença para a abundância de fungos e bactérias nas diferentes classes de solos, provavelmente pode estar relacionada às características particulares dos solos analisados. Embora não exista diversidade vegetal na área avaliada, existe variação para a abundância de bactérias e fungos entre as classes de solos, sendo que a maior abundância de bactérias foi encontrada na classe de solo LVw1 quando comparado as demais classes. Os menores valores para abundância de bactérias foram encontrados na classe de solo FFc1. Os resultados indicam que existe uma uniformidade dos perfis das comunidades bacterianas e fúngicas entre as classes de solos (Figura 1.7 e 1.8). Pouco se conhece sobre esta diferenciação em solos distintos dentro de uma mesma área.

A maior abundância de fungos na classe de solo FFc1 pode estar associada as suas características morfológicas. Segundo Gatto et al. (2010), os Plintossolos Pétricos são solos jovens, com características morfológicas pouco definidas, pouco profundo ou com pequena expressão dos processos pedogenéticos, podendo ter modificações pouco expressivas no material de origem, como a presença ou não de horizonte B definido e decréscimo irregular do teor de carbono com a profundidade.

O Plintossolo Pétrico pode ser um habitat principalmente para os fungos, uma vez que as microrregiões dentro de agregados do solo podem controlar a natureza e a disponibilidade de recursos disponíveis, impactando diretamente a dinâmica populacional, a distribuição de

microrganismos do solo não é aleatória, porém existem padrões espaciais previsíveis em amplas escalas, como espaços porosos do solo, a umidade, temperatura e pH (KANDELER, 2007).

Deve-se considerar que a área experimental foi manejada para a implantação das culturas do café e do milho. O manejo em áreas agrícolas pode interferir direta e indiretamente na abundância de bactérias e fungos do solo.

3.4.3 Avaliação da estrutura da comunidade por TRFLP

Os resultados indicam que houve variabilidade temporal entre as épocas avaliadas (diferentes manejos realizados). Este resultado pode estar relacionado às mudanças do solo. Sabe-se que a biodiversidade microbiana do solo é sensível às mudanças antropológicas provocadas pelas práticas de manejo e aos diferentes usos do solo e que um sistema de monocultivo pode ocasionar uma pressão de seleção e a diminuição da biodiversidade microbiana no ambiente (SPEEDING et. al. 2004).

A variabilidade temporal podendo esta estar ligada ao uso diferenciado dos solos analisados (Figura 1.9). A maior diferenciação ocorre na amostragem 1 (setembro/2016) em relação as demais (eixo horizontal), enquanto que as amostragens 2 e 3 (janeiro e julho/2017 respectivamente) se separam no segundo eixo da PCoA.

Houve menor riqueza e diversidade microbiana para bactérias após o manejo do solo para preparo do plantio, quando avaliado entre as épocas de coleta de solos, podendo causar uma mudança significativa do padrão funcional normal da comunidade microbiana (Figura 1.10, 1.11, 1.13 e 1.14). Sabe-se que o solo possui características que podem estar ligadas às características ecológicas da comunidade microbiana que ali existe, assim a especificidade de grupos microbianos em determinadas classes de solos está ligada à sua diversidade metabólica, no qual diferentes processos biológicos são executados por diferentes grupos microbianos em condições ambientais distintas (ROUSK; BROOKES; BÅÅTH, 2009).

Ainda pode-se destacar que, ecologicamente, no solo ocorrem processos similares sendo realizados por diferentes grupos de microrganismos (ANDREOTE; CARDOSO, 2016), desta forma quando temos um solo não manejado e sim equilibrado biologicamente e que suas características permanecem heterogêneas pode-se dizer que, neste existe uma alta redundância funcional, ocorrendo diferentes processos biológicos e químicos ao mesmo tempo (ROSENFELD, 2002; ANDREOTE; CARDOSO, 2016). As classes de solos cultivada com milho, fornecem um ambiente mais homogêneo em termos de matéria orgânica, umidade e

temperaturas possibilitando o desenvolvimento de comunidades microbianas e influenciar diretamente em sua estrutura e composição.

Entretanto, ao longo do tempo a comunidade microbiana pode desenvolver a capacidade de retornar ao seu estado original, após o manejo do solo. A resiliência do solo é afetada pelas características inerentes e dinâmicas do solo, variam de uma área para outra e mudam com o tempo (MACEWAN, 1997; SEYBOLD; HERRICK; BREJDA, 1999).

Assim, entende-se que o manejo do solo inicial adotado na área (preparo da área para cultivo do cafeeiro arábica em setembro/2016) proporcionou alterações nas comunidades microbianas. A comunidade microbiana dos solos foi sensível às perturbações no ambiente. Quando comparado a estrutura da comunidade microbiana ao longo do tempo (três coletas de solos) percebe-se que houve mudança estrutural da comunidade bacteriana ao longo do tempo, provavelmente as comunidades microbianas sofreram perturbações no qual sua estrutura foi modificada. Entretanto sabe-se que ao longo do tempo em condições de um manejo sustentável do solo as comunidades microbianas podem voltar ao seu estado de composição e estrutura iniciais, devido ao seu rápido desenvolvimento e a sua resiliência.

3.4.4 Sequenciamento de genes bacterianos e fúngicos

Os resultados para os valores dos índices de diversidade de Shannon-Wiener e de Chao 1 para o número de espécies observadas para o gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) mostram que não houve diferença entre as classes de solos para o índice de diversidade de Shannon-Wiener, entretanto quando se observa os valores do índice de Chao 1, a classe de solo LAw1 apresentou maior valor quando comparado as demais classes de solos (Tabela 1.4.).

Embora existam diferenças físicas e químicas dentro de cada classe de solo, não houve a presença de filos bacterianos exclusivos para cada classe quando avaliado a abundância relativa de filos, principalmente pela ausência de limitação de dispersão dos grupos microbianos na área analisada.

Os filos Proteobacteria e Actinobactéria apresentaram abundância relativa mais alta quando comparado aos demais filos (Figura 1.15.). O sequenciamento do DNA das amostras para bactérias mostra que sete dos filos na ordem Proteobacteria > Actinobacteria > Chloroflexi > Acidobacteria > Gemmatimonadete > Planctomycetes ≥ Verrucomicrobia estavam presentes e dominantes em todos os solos.

O filo da Proteobacteria é composto por bactérias Gram-negativas, comuns em solos e estão relacionadas a uma alta diversidade de funções, estas participam dos processos de ciclagem do carbono, nitrogênio e do enxofre (SPAIN; KRUMHOLZ; ELSHAHED, 2009).

O filo da Actinobacteria desempenha várias funções nos ecossistemas do solo, produzem metabólitos secundários podendo ter efeito antagonista com outros microrganismos do solo e também degradam diferentes compostos orgânicos complexos e relativamente recalcitrantes (VASCONCELLOS et al., 2010). Gênero deste filo, como o *Streptomyces* conseguem demonstrar um efeito de inibição do crescimento contra *Rhizoctonia solani* in vitro, indicando seu potencial para ação de biocontrole de doenças no solo (ZAMBRANO; PARRA; ORTIZ, 2021).

Assim como a composição de filos bacterianos, não houve exclusividade dentro dos filos para abundância relativa nas diferentes classes de solos a partir do o sequenciamento do gene ITS 18S rRNA fúngico. O sequenciamento do DNA das amostras para fungos mostra que três dos filos na ordem Ascomycota > Basidiomycota > Mortierellomycota estavam presentes e dominantes em todos os solos.

O filo Ascomycota é o maior grupo do Reino Fungi, estão presentes em diversos ambientes, e tem grande importância agrônômica. Algumas espécies deste grupo são fungos fitopatogênicos, ocasionando perdas na agricultura durante o cultivo e na pós-colheita. Entretanto outros componentes deste filo atuam como agentes de controle biológico de pragas e doenças, como exemplo o gênero *Trichoderma* sp. Os organismos do filo *Ascomycota* estão em sua maioria formam leveduras e estabelecem relações mutualísticas com algas ou cianobactérias, formando os líquens. O manejo dos solos não foi intenso ao ponto de modificar os índices de riqueza destes organismos.

Algumas diferenças importantes existem dentro das características físico-químicas das classes de solos, entretanto para as análises baseadas em na filogenética fica evidenciado que a abundância relativa dentre os gêneros é modulada de acordo com a classe de solo, entretanto a composição da comunidade bacteriana não é diferente entre as classes de solos.

Ambos os fatores bióticos e abióticos impõem uma forte seleção na composição da comunidade microbiana, além de que o genótipo da planta e o uso de práticas agrícolas específicas afetam as características física e químicas do solo (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014).

Entende-se que o manejo realizado nas classes de solos não foi intenso ao ponto de modificar a composição da comunidade microbiana e não interferir na diversidade bacteriana e fúngica dos solos.

A partir deste estudo entende-se que as características do solo são melhoradas a partir do incremento de matéria orgânica, no qual o fornecimento de material orgânico no solo aumenta a atividade biológica e estimula a ocorrência de processos naturais no solo, como a ciclagem de nutrientes. O incremento de material orgânico no solo pode ser realizado anteriormente ao plantio do cafeeiro arábica, possibilitando melhorias em suas características químico-físicas e biológicas, independentemente das classes de solos.

Por se tratar de uma área agrícola é importante buscar pelo equilíbrio nutricional das plantas, no qual deve-se fornecer uma adubação mineral e orgânica balanceada e equilibrada para que as comunidades microbianas do solo desempenhem suas funções dentro do sistema. Quando o solo é manejado de forma biologicamente equilibrada ao longo do tempo, o mesmo se torna mais sustentável (atividade biológica equilibrada e disponibilidade de material orgânico disponível em quantidade, qualidade e diversidade), possibilitando a diminuição de fertilização mineral e defesa natural contra patógenos do solo no cultivo do cafeeiro, possibilitando ao cafeicultor a diminuição em custos de produção.

Entretanto deve-se realizadas análises para avaliar a biologia do solo durante as safras (períodos mais prolongados), para que o monitoramento seja eficiente evitando perdas dentro da lavoura.

3.5 CONCLUSÕES

A substituição de cultivo natural por cultivo de café arábica e milho em diferentes classes de solos modula a comunidade microbiana de acordo com o manejo de cultivo, sendo as mudanças nas propriedades do solo específicas para cada tipo de solo.

As enzimas do solo são influenciadas por uma série de fatores naturais, como as classes e matéria orgânica dos solos e por fatores antropogênicos como a instalação de cultivos em solos.

O manejo do solo realizado tem papel fundamental na definição de mudanças na atividade e estrutura da comunidade microbiana.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K.; NILSSON, R.H.; LARSSON, K.H.; ALEXANDER, I.J.; EBERHARDT, U.; ERLAND, S.; HOILAND, K.; KJØLLER, R.; LARSSON, E.; PENNANEN, T.; KÖLJALG, U. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, v. 186, p. 281-285, 2010.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v.71, p. 528-539, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>
- ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do solo**. 2ª Edição. Piracicaba, ESALQ. 2016, 225p.
- BALOTA, E. L.; CHAVES, J. C. D. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1573-1583, 2010.
- BOLYEN, E.; et al., QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, v. 2, 2018.
- BURNS, R. G.; DEFORESTB, J.L.; MARXSENC, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGERE, M. E.; WALLENSTEINF, M. D.; WEINTRAUBG, M. N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216–234, 2013.
- CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; NOAH FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, p. 4516-4522, 2011.
- CARDOSO, E. J. B. N.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BINI, D.; MIYAUCHI, M. Y. H.; SANTOS, C. A. DOS; ALVES, P. R. L.; PAULA, A. M. DE; NAKATANI, A. S.; PEREIRA, J. DE M.; NOGUEIRA, M. A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 274-289, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400009>.
- EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, p.996–998, 2013.
- DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p.141–146, 1997.
- EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLOCKER, H.; EMDE, M.; BOTTGGER, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 7843–7853, 1989.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro; 2006.
- FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M. A.; CLEVELAND, C. C. Global patterns in belowground communities. **Ecology Letter**, v.12, p.1238-1249, 2009.
- GATTO, A.; BARROS, N.F. DE; NOVAIS, R.F.; SILVA, I. R. DA; LEITE, H. G.; LEITE, F. P.; VILLANI, E.M. DE A. Estoques de carbono no solo e na biomassa em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1069-1079, 2010.
- GUDEA, A.; KANDELER, E.; GLEIXNER, G. Input related microbial carbon dynamic of soil organic matter in particle size fractions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. p. 209-219, 2012.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYA, P.D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, v.4, p.1-9, 2001.

- JENNY, H. **Factors of soil formation: a system of quantitative pedology**. General Publishing Company, 1941. 191p.
- KANDELER, E. **Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function**. In: ELDOR, A. P. (Ed.). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2007. p. 53 – 80.
- LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 82, p. 6955–6959, 1985.
- MACEWAN, R. J. Soil quality indicators: Pedological aspects. In: **Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health**. E.G. Gregorich and M.R. Carter. (eds.). Elsevier Science, 1997, p. 143-166.
- MACALADY, J. L.; FULLER, M. E.; SCOW, K. M. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, p. 54-63, 1998
- MASTO, R. E.; PRAMOD, K.; SINGH, C. D.; PATRA, A. K. Changes in soil quality indicators under long-term sewage irrigation in a sub-tropical environment. **Environmental Geology**, v.56, p.1237-1243, 2009.
- MELO, W. J.; MARCHIORI JR, M. Carbon, microbial biomass carbon and enzyme activity of a soil under natural forest, grassland and cotton culture. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 257-263, 1999.
- MENDES, I. C.; DE SOUSA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. C. Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. **Embrapa, Circular técnica nº 38**, v. 1, p. 1-24, 2018.
- MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, 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**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NIERO, L. A. C.; DECHEN, S. C. F.; COELHO, R. M.; MARIA, I. C. de. Avaliações visuais como índice de qualidade do solo e sua validação por análises físicas e químicas em um Latossolo Vermelho distroférrico com usos e manejos distintos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1271-1282, 2010.
- NOGUEIRA, M. A.; TELLES, T. S.; FAGOTTI, D. DOS S. L.; BRITO, O. R.; PRETE, C. E. C.; GUIMARÃES, M. DE F. Indicators of soil quality in the implantation of no-till system with winter crops. **Revista Ciência Agrônômica**, v.45, p.990-998, 2014.

- NDOUR, P. M. S.; BARRY, C. M.; TINE, D.; CANTÓ, C. D. F.; GUEYE, M.; BARAKAT, M.; ORTET, P.; ACHOUAK, W.; NDOYE, I.; SINE, B.; LAPLAZE, L.; HEULIN, T.; COURNAC, L. Pearl millet genotype impacts microbial diversity and enzymatic activities in relation to root-adhering soil aggregation. **Plant and Soil**, v. 1, p. 1-21, 2021.
- PARADA, A.E.; NEEDHAM, D.M.; FUHRMAN, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v.18, p. 1403-1414, 2016.
- PLAZA, C.; COURTIER-MURIAS, D.; FERNÁNDEZ, J. M.; POLO, A.; SIMPSON, A. J. Physical, chemical, and biochemical mechanisms of soil organic matter stabilization under conservation tillage systems: A central role for microbes and microbial by-products in C sequestration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 124-134, 2013.
- PULLEMAN, M.M.; MARINISSEN, J.C.Y. Physical protection of mineralizable C in aggregates from long-term pasture and arable soil. **Geoderma**, v. 120, p. 273-282, 2004.
- PRINGLE, M. J.; ALLEN, D. E.; ORTON, T. G.; BISHOP, T. F. A.; BUTLER, B. W.; HENRY, B. K.; DALAL, R. C. Effects of land-use change and management on soil carbon and nitrogen in the Brigalow Belt, Australia: II. Statistical models to unravel the climate-soil-management interaction. **The Rangeland Journal**, v.38, p.453–466, 2016.
- PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.; MORAIS, D.K.; CLARK, I.M.; HIRSCH, P.R.; TÓTOLO, M.R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v.107, p.30–37, 2014.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p.590–596, 2013.
- ROUSK, J.; BROOKES, P. C.; E. BÅÅTH. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.1589–1596, 2009.
- ROSENFELD, J.S. Functional redundancy in ecology and conservation. **Oikos**, v.98, p.156-162, 2002. DOI:<https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.980116.x>
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2007. <http://www.R-project.org>.
- SAKURAI, M.; WASAKI, J.; TOMIZAWA, Y.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.54, p.62–71, 2008.
- SARKAR, J.; LEONOWICZ, A.; BOLLAG, J. M. Immobilization of enzymes on clays and soils. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 21, p. 223- 230, 1989.
- SEYBOLD, C. A.; HERRICK, J. E.; BREJDA, J. J. Resiliência do solo: um componente fundamental da qualidade do solo. **Ciência do solo**, v.164, p.224-234, 1999.
- SCHÜTTE, U.M.E.; ABDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; SCHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.J. Bacterial succession in a glacier foreland of the high Arctic. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 3, p. 1258–1268, 2009.
- SILVA, E. M. DA; MALVINO, S. S. A. B. Análise climática do município de Patrocínio (MG). **Caminhos de Geografia**, v.16, p.93-108, 2005.
- SIMON, C. A.; CORDEIRO, M. S.; LIMA, S. F. DE; BRASIL, M. DA S.; DE DAVID, C. H.; SECCO, V. A. Microbial activity in a soil with cover crops in succession with maize in a no-tillage system. **Brazilian Journal of Agriculture**, v.92, p. 198 – 207, 2019.
- SIX, J.; FELLER, C.; DENEFF, K.; OGLE, S.; AS, J. C. DE M.; ALBRECHT, A. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - Effects of no-tillage. **Agronomie**, v. 22, p.755-775, 2006.

- SIX, J.; CONANT, R.T.; PAUL, E.A.; PAUSTIAN, K. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. **Plant and Soil**, v. 241, p. 155–176, 2002.
- SPAIN, A. M.; KRUMHOLZ, L. R.; ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. **International Society for Microbial Ecology**, v.3, p 992-1000, 2009.
- SPEEDING, T.A.; HAMEL, C.; MEHUYS, G.R.; MADRAMOOTOO, C.A. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.499-512, 2004.
- TABATABAI, M. A. **Enzymes**. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A. & WOLLUM, A., eds. Methods of soil analysis. Microbial and biochemical properties. Madison, Soil Science Society of America, 1994. Part 2. p.775-833.
- VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolamento e triagem de actinobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGP) do solo da rizosfera de Araucaria angustifolia. **Scientia Agricola**, v. 67, p.743-746, 2010.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. **New York: Academic Press**, v.1, p. 315-322, 1990.
- WALTERS, W.; HYDE, E.R.; BERG-LYONS, D.; ACKERMANN, G.; HUMPHREY, G.; PARADA, A.; GILBERT, J.A.; JANSSEN, J.K.; CAPORASO, J.G.; FUHRMAN, J.A.; APPRILL, A.; KNIGHT, R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **mSystems**, v. 1, 2016.
- ZAMBRANO, E. C.; PARRA, A. S.; ORTIZ, Á. M. M. Biocontrol of rice sheath blight with microorganisms obtained in rice cultivated soils. **Bragantia**, v. 80, e0921, 2021.

4 EFEITO DO CULTIVO DE COBERTURAS VEGETAIS NA ATIVIDADE E A DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

Resumo

As plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas de café arábica podem diminuir os custos com insumos, promover a cobertura do solo (com a cultura viva ou com a palhada), proteger o solo contra erosão e inibir o desenvolvimento de plantas invasoras, bem como beneficiar a comunidade microbiana do solo em decorrência do fornecimento de matéria orgânica. Estes benefícios têm levado a um maior interesse do setor produtivo em consorciar as plantas de coberturas nas entrelinhas de café arábica durante as épocas de inverno e verão. No entanto, ainda são poucos os estudos que descrevam a influência desta prática sobre a fração viva do solo. Assim, objetivou-se avaliar a atividade enzimática dos solos e a estruturação das comunidades microbianas dos solos cultivados com diferentes plantas de cobertura, manejadas nas entrelinhas de café arábica. Foram realizados dois experimentos em 2017 em uma área de cultivo na cidade de Patrocínio/MG, onde as plantas de cobertura foram semeadas nas entrelinhas de café arábica no inverno e no verão. No verão utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 2 (3 diferentes plantas de coberturas: *Crotalaria spectabilis*, *Cajanus cajan* e vegetação espontânea avaliadas em 2 épocas [março e abril/2017], com quatro repetições cada. Para as plantas de cobertura de inverno, o delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 5 (três áreas semeadas no verão com: vegetação espontânea, *Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan* e 5 áreas semeadas no inverno com *Avena strigosa*, *Vicia cracca*, *Raphanus sativus* L., mix, e uma área com vegetação espontânea) avaliadas em setembro/2017, com três repetições cada. Os parâmetros avaliados foram: atividade enzimática da fosfatase ácida, arilsulfatase e da β -glucosidase e a descrição da estrutura microbiana dos solos cultivados por meio da técnica de Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP). Os resultados mostram que as leguminosas influenciaram no aumento da atividade enzimática do solo quando comparado à área de plantas invasoras. As plantas de cobertura antecessoras ao cultivo de plantas de cobertura semeadas no inverno não mostraram influência para a atividade enzimática da fosfatase ácida e da arilsulfatase, mas interferiram diretamente na atividade da β -glucosidase. O uso de plantas de coberturas nas entrelinhas do cafeeiro arábica tem impacto na estrutura da comunidade bacteriano (gene *rrs* 16S rRNA), resultando em modificações mais brandas nas áreas cultivadas no inverno associadas ao cultivo de verão anterior à crotalaria e ao feijão guandu.

Palavras-chave: *Crotalaria spectabilis*; Plantas invasoras; Coffee arábica L. Arilsulfatase; β -glucosidase

Abstract

Effect of growing coffee between rows on soil microbial activity and diversity

Cover plants grown between Arabica coffee rows can reduce input costs, promote soil cover (with live culture or straw), protect the soil from erosion and inhibit the development of invasive plants, as well as benefiting the soil microbial community as a result of the supply of organic matter. These benefits have led to greater interest from the productive sector in intercropping cover crops between Arabica coffee rows during the winter and summer seasons. However,

there are still few studies that describe the influence of this practice on the living fraction of the soil. Thus, the objective was to evaluate the enzymatic activity of soils and the structuring of microbial communities in soils cultivated with different cover crops, managed between Arabica coffee rows. Two experiments were carried out in 2017 in a growing area in the city of Patrocínio/MG, where the cover crops were sown between Arabica coffee rows in winter and summer. In summer, an experimental design was used in randomized blocks in a 3 x 2 factorial scheme (3 different cover plants: *Crotalaria spectabilis*, *Cajanus cajan* and spontaneous vegetation evaluated in 2 seasons [March and April/2017], with four replications each. In winter, the experimental design was in randomized blocks in a 3 x 5 factorial scheme (three areas sown in summer with: spontaneous vegetation, *Crotalaria spectabilis* and *Cajanus cajan* and 5 areas sown in winter with *Avena strigosa*, *Vicia cracca*, *Raphanus sativus* L., mix, and an area with spontaneous vegetation) evaluated in September/2017, with three replications each. The parameters evaluated were: enzymatic activity of acid phosphatase, arylsulfatase and β -glucosidase and the description of the microbial structure of soils cultivated by using the Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) technique. The results show that legumes influenced the increase in the enzymatic activity of the soil when compared to the area of invasive plants. Cover crops that preceded the cultivation of cover crops sown in winter showed no influence on the enzymatic activity of acid phosphatase and arylsulfatase, but interfered directly in the activity of β -glucosidase. The use of cover crops between Arabica coffee plants has an impact on the bacterial community structure (gene rrs 16S rRNA), resulting in milder modifications in winter cultivated areas associated with summer cultivation prior to sunn hemp and pigeon pea.

Keywords: *Crotalaria spectabilis*; Invasive plants ; *Coffea arabica* L ; Arylsulfatase ; β -glucosidase

4.1 Introdução

Nos últimos anos, a busca por um manejo mais sustentável do solo vem ganhando destaque na agricultura, principalmente em decorrência de seu potencial em fornecer nutrientes ao solo e possibilitar a melhoria dos recursos biológicos do solo, além disso sabe-se que um manejo mais sustentável melhora o desenvolvimento do cafeeiro (VILELA et al., 2011). Desta maneira, pode-se utilizar as plantas de cobertura com o objetivo de diminuir os custos com insumos industriais para a cafeicultura, assim como aumentar os efeitos benéficos proporcionados pela adição de fitomassa vegetal aportado sob o solo, influenciando nas características químicas, físicas e biológicas do solo.

Diferentes estudos relacionados ao manejo da entrelinha do cafeeiro são encontrados na literatura, como o de Paulo et al. (2001), no qual os autores, avaliando a produtividade do cafeeiro da cultivar Apotã IAC 2258 submetido à adubação verde com leguminosas, descrevem que o consórcio do cafeeiro com soja, mucuna anã e *Crotalaria spectabilis* não diminuiu a produtividade do cafeeiro, e ainda o consórcio mostrou correlação positiva com a altura e diâmetro do caule das plantas de café no ano da colheita. De maneira complementar,

Guimarães et al. (2017), avaliando a influência de diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro na biomassa e atividade microbiana do solo, descrevem que os sistemas consorciados com espécies arbóreas mais *U. decumbens* e de cafeeiro em consorciação com *U. decumbens* favorecem a biomassa e a atividade microbiana do solo.

O cultivo de plantas de cobertura sobre o solo pode promover modificações benéficas dentro dos parâmetros químicos, no qual os processos de mineralização e imobilização estão associados e determinam a disponibilização de nutrientes por processos biológicos (ANDREOTE; CARDOSO, 2016). As características químicas como os teores de pH, carbono orgânico do solo e nutrientes do solo, dentre outras, são essenciais para a permanência, adaptabilidade e modulação da comunidade microbiana do solo (LUO et al., 2016). Deste modo, os parâmetros biológicos estão conectados aos parâmetros químicos, de modo que os materiais vegetais aportados sob o solo, após sua senescência, disponibilizam moléculas orgânicas que podem ser convertidas em moléculas inorgânicas por meio da atividade de enzimas exógenas liberadas por microrganismos no solo. Em seus resultados, Leite et al. (2016) afirmam que o cultivo de crotalária, lablab e mucuna como plantas de cobertura em pré-safra de milho aumentam o P orgânico moderadamente lábil na camada superficial do solo, em relação a área de vegetação espontânea.

Os parâmetros físicos do solo, como a textura, a estrutura (agregação), resistência a penetração e a capacidade de água disponível também estão amplamente conectados aos parâmetros químicos e biológicos do solo, pelo fato de que estes fatores influenciam no desenvolvimento de macro, meso e microrganismos. Estes estão intimamente relacionados com o enraizamento das culturas, a percolação ou a transmissão de água e o sistema de cultivo, que são peças chave para o estabelecimento de um habitat microbiano no solo (DUFRANC et al. 2004).

A heterogeneidade dos solos pode promover a capacidade de ocupação deste ambiente por organismos de diferentes espécies e funções microbianas, além disto, a dinâmica de resíduos vegetais é dependente da natureza do material e do volume de sua produção vegetal, do manejo da cultura de cobertura, da fertilidade, dentre outros fatores abióticos do solo, sendo que estes fatores isolados ou em conjunto podem influenciar a atividade biológica do solo (ALVARENGA et al., 2001).

A hipótese deste trabalho é de que diferentes plantas de cobertura vegetal cultivadas na entrelinha de café arábica podem influenciar na atividade enzimática e na estrutura da comunidade de bactérias do solo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática e a estrutura da comunidade bacteriana dos solos cultivados com diferentes plantas

de cobertura manejadas nas entrelinhas de café arábica no período de inverno e verão.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da área

O estudo foi conduzido em uma área experimental localizada no município de Patrocínio (MG), com altitude média de aproximadamente 1.161 m de elevação, a uma latitude 18°43'17.27"S e longitude 46°57'48.97"O. O município possui um clima Cwa, com médias térmicas variando de 19°C a 27°C, com pluviosidade média de 1500 mm/ano⁻¹ (SILVA; MALVINO, 2005).

Para a realização do estudo, foi selecionada uma área já cultivada com café arábica, com a cultivar Catuaí Amarelo 62. A área total corresponde a 19 ha, sendo que no verão houve o plantio nas entrelinhas com plantas leguminosas, correspondendo a 5,2 ha cultivados com *Crotalaria spectabilis* (crotalária) e 5,2 ha cultivados com *Cajanus cajan* (feijão guandu anão) (Figura 2.1), e uma área de vegetação espontânea como testemunha. Foram estabelecidos dois experimentos.

Figura 2.1 - Setor A, com 10,40 ha, de produção com cultivo nas entrelinhas com plantas de cobertura (A) e área experimental com planta de cobertura de verão em crescimento (B). Área da BioTerra pertencente a Fazenda DaTerra, Patrocínio, MG.

As entrelinhas de café arábica foram adubadas com 250 kg/ha de superfosfato simples. No verão, estas áreas foram semeadas com três linhas no espaçamento de 0,40 m entre si, utilizando 40 sementes m⁻¹ de *Crotalaria spectabilis* e 25 sementes m⁻¹ linear de *Cajanus cajan*. Em abril/2017, as plantas de cobertura e a área de testemunha foram submetidas à roçagem. No inverno houve o cultivo nas entrelinhas de *Avena strigosa* (aveia preta), *Vicia cracca* (ervilhaca comum), *Raphanus sativus* L. (nabo forrageiro) e um mix representado pelas três plantas, ambos

semeados no espaçamento de 0,40 m entrelinha. Os solos de vegetação espontânea foram constituídos por gramíneas e plantas invasoras.

O delineamento experimental para as plantas semeadas no verão foi em blocos casualizados, sendo utilizados 3 áreas cultivadas com duas plantas de coberturas (*Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan*) e a uma área controle constituída por vegetação espontânea avaliadas em 2 épocas (março e abril/2017), com quatro repetições.

Para as plantas semeadas no inverno, o delineamento experimental foi em blocos casualizados, sendo três áreas cultivadas no verão com crotalária, feijão guandu e vegetação espontânea e 5 áreas cultivadas no inverno sob as áreas cultivadas no verão, sendo estas: vegetação espontânea, aveia preta, nabo forrageiro, ervilhaca comum, e mix (aveia preta + nabo forrageiro + ervilhaca comum), avaliadas em setembro/2017, com três repetições.

4.2.2 Coleta e caracterização química dos solos

As coletas para as análises dos atributos biológicos e químicos dos solos foi realizada nas entrelinhas do cafeeiro arábica. Para os solos cultivados com as plantas de inverno foram realizadas as caracterizações de fertilidade do solo na profundidade de 0,0 a 0,10 e massa seca da planta de cobertura, sendo as necessidades de manejo nutricional, de plantas, pragas e doenças realizados pela propriedade (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Características químicas do solo em diferentes sistemas de cultivo na entrelinha do cafeeiro, na camada de 0,0 – 0,10 m de profundidade para as plantas de cobertura de inverno. Fazenda DaTerra, Patrocínio, MG (2017).

		Plantas de cobertura							
		F+A	F+E	F+NF	F+M	C+A	C+E	C+NF	C+M
pH		6,5	5,9	6,3	6,4	6,5	6,3	6,4	6
MO		49	40	55	51	52	45	51	43
Ca	mmolc.dm ⁻³	59	52	67	54	79	63	65	48
Mg		22	12	29	21	22	17	20	13
K		6,3	6,9	9,5	10,8	13,1	8,7	9,5	6,7
H+Al		15	21	18	17	16	17	16	20
SB		87,3	70,9	105,5	85,8	114,1	88,7	94,5	67,7
CTC		102	92	124	103	130	106	111	88
V	%	86	77	85	83	88	84	85	77
P	mg.dm ⁻³	60	20	56	58	97	87	37	39
B		0,67	0,55	1,25	1	1,3	1,03	1,03	0,58
Cu		3,2	3,1	4,8	2,9	3,7	3,8	3,8	4,1
Fe		28	45	38	35	34	31	30	41
Mn		7	4,2	10,7	6,6	7,4	6,9	7,8	4,8
Zn		5,3	2,9	8,5	5,1	5,9	7,3	6,7	5,4
Ca	%	58	57	54	52	61	59	59	55
Mg		22	13	23	20	17	16	18	15
K		6	8	8	10	10	8	9	8

F+A= feijão guandu=aveia preta; F+E= feijão + ervilhaca; F+NF= feijão+nabo forrageiro; F+M= feijão+mix; C+A= crotolária+aveia preta; crotolária+ervilhaca; C+NF= crotolária+nabo forrageiro; C+M= crotolária+ mix; pH (CaCl₂)= potencial hidrogeniônico; MO (g.dm⁻³)= matéria orgânica do solo; Ca=cálcio; Mg=magnésio; K=potássio; H+Al= hidrogênio + alumínio; SB= soma de bases; CTC= capacidade de troca catiônica; V (%)= saturação de bases; P=fósforo em resina; B= boro; Cu= cobre; Fe= ferro; Mn= manganês; Zn= zinco.

4.2.3 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Os atributos microbiológicos do solo foram avaliados pela atividade enzimática da arilsulfatase, da fosfatase ácida e da β -glucosidase. A metodologia empregada para avaliação enzimática foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tabatabai (1994), utilizando a determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol liberado pela arilsulfatase, fosfatase ácida e β -glucosidase após incubação do solo com substrato específico (*p*-nitrofenol-sulfato, *p*-nitrofenol-fosfato e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, respectivamente), em triplicatas. Preparou-se uma curva padrão com as concentrações conhecidas de *p*-nitrofenol (0, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g de *p*-nitrofenol ml⁻¹) para determinar a quantidade de *p*-nitrofenol liberada. Procedeu-se com a leitura das amostras com um espectrofotômetro a 410 nm de absorvância, sendo os valores de atividade enzimática expressos em μ g *p*-nitrofenol h⁻¹ g⁻¹ solo.

Para a análise dos bioindicadores os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias para os resultados foram realizadas utilizando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software SISVAR (FERREIRA, 2011).

4.2.4 Extração de DNA dos solos

A extração de DNA total do solo foi realizada com o kit comercial *PowewSoil*[®] DNA (Mobio Laboratories), seguindo as instruções do fabricante, utilizando 0,4 g de solo. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), com solução tampão TAE 1X (tris-acetato-EDTA) juntamente com o marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1 kb* (Invitrogen) e 2 μ l do padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). A eletroforese foi realizada a 10V.cm⁻¹, corada com solução de *GelRed*TM 1000x e foto documentada em luz ultravioleta pelo *ImageQuant TL* software program (GE Healthcare Life Sciences), após a extração os DNAs foram armazenados a -20° para uso posterior.

4.2.5 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

Esta análise foi realizada para o estudo das comunidades de bactérias nas amostras dos solos para as plantas de cobertura de inverno e verão.

A estrutura da comunidade bacteriana foi acessada por meio do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). A amplificação do gene alvo de bactérias, o *rrs* (16S rRNA), foi realizada usando os iniciadores 8-FM (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) (EDWARDS et al., 1989) e 926r (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT -3') (LANE et al., 1985).

Os ciclos das reações foram iniciados com a desnaturação a 95°C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e uma extensão final de 72°C por 10 min. O volume final das reações foi de 50 µL, contendo 6 µL de MgCl₂ (concentração final de Mg²⁺ de 3 mM), 0,2 µL (equivalente a 1U) de “Taq” polimerase, 5 µL do tampão livre de Mg²⁺ para “Taq” polimerase (100 mM Tris-Cl (pH 8,8), 500 mM KCl, 1% Triton-X-100) (Sinapse Inc, São Paulo, Brasil), 4 µL de “Deoxynucleoside Triphosphate” (dNTP) (0,2 mM de cada base nitrogenada), 0,1 µL de cada iniciador (0,01 mM) (8-FM e 926r, previamente mencionados), e 1 µL de DNA molde, completando com 33,6 µL de água ultrapura autoclavada. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

A qualidade das reações foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 % corrido em 90 V por 60 min em tampão de tris-acetato-EDTA (TAE 1x) utilizando 5 µl do produto de PCR corado com GelRed™ (0,5 µg mL⁻¹), visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados com adição de 200µL de álcool isopropílico P.A (PM = 60,1) por amostra, seguido por incubação por 2 horas à -20 °C e centrifugação a 4000 rpm por 90 min a 4 °C.

Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 250 µL de álcool etílico absoluto (70 %) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras nas condições supracitadas. O sobrenadante foi descartado e as amostras centrifugadas invertidas até atingir a rotação de 250 rpm. Ressuspendeu-se as amostras com 25 µL de água ultrapura autoclavada e acondicionou-se em freezer a -20 °C e a qualidade da purificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 2 % após um período de 8 horas de hidratação. O volume final das reações de digestão (clivagens) foi de 20 µL, contendo 10 µL do produto de PCR purificado

(aproximadamente 100 ng), 2,0 µL do tampão da enzima (10X Buffer Tango), 0,5 µL da enzima Anza™ 59Hhal I (5 U) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) completando com 7,5 µL de água ultrapura e mantidos em 37 °C por 3 horas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

Logo após estes produtos foram precipitados adicionando para cada amostra, 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de acetado de sódio 3 M e 50 µL de álcool etílico absoluto P.A e deixado em repouso por 15 min seguido de centrifugação a 2128 rpm por 30 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 70 µL de álcool etílico absoluto (70 %) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras por 20 min a 2128 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas ao ar por 40 min. Logo após as amostras foram resuspendidas usando formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Life Technologies) com marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies) e analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Os resultados foram processados usando o software GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras.

Os resultados para o T-RFLP foram obtidos somente para o gene bacteriano *rrs* (16S rRNA), os mesmos foram avaliados pela análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) no programa R 2.15.1 Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing. As figuras do NMDS foram geradas utilizando a ferramenta estatística do Software RStudio, com o pacote “Vegan”. Também foi realizada análise de Similaridade (ANOSIM).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Os resultados para as áreas com as plantas de cobertura semeadas no verão não mostraram interação significativa entre os as plantas de cobertura e as épocas (março e abril/2017) avaliadas, no entanto quando avaliado cada parâmetro individualmente houve significância dos dados ($P > F_c$ 0,05). As leguminosas aumentaram a atividade enzimática da fosfatase ácida nos solos cultivados nas entrelinhas de café arábica quando comparado com a área de vegetação espontânea. Os solos cultivados com *Cajanus cajan* mostraram maior atividade enzimática para a fosfatase ácida e arilsulfatase. A atividade biológica para as enzimas avaliadas foi menor nos solos com vegetação espontânea (Tabela 2.2). Para a β -glucosidase não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 2.2 - Atividade enzimática de solos cultivados com diferentes plantas de cobertura de verão nas entrelinhas de café arábica.

Plantas de cobertura	Fosfatase ácida	Arilsulfatase
	(µg p-nitrofenol h ⁻¹ g ⁻¹ solo)	
Vegetação espontânea	969,99 b	157,05 b
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1137,87 a	180,18 b
<i>Cajanus cajan</i>	1141,03 a	216,16 a
CV (%)	6,26	13,17

CV= coeficiente de variação.

A época de março/2017 proporcionou menor atividade enzimática para todas as enzimas, enquanto que a segunda coleta em abril/2017 proporcionou maior atividade enzimática ao solo cultivado com as plantas de cobertura, o que pode estar relacionado ao fato da incorporação do material vegetal no solo após a roçagem das plantas (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Atividade enzimática de solos cultivados com diferentes plantas de cobertura de verão nas entrelinhas de café arábica em duas épocas de avaliação (março/2017 e abril/2017).

Épocas de avaliação	Fosfatase ácida	Arilsulfatase	β-glucosidase
	(µg p-nitrofenol h ⁻¹ g ⁻¹ solo)		
Março/17	977,30 b	149,54 b	75,98 b
Abril/17	1188,63 a	219,39 a	170,27 a
CV (%)	6,26	13,17	49,78

CV= coeficiente de variação.

Para as plantas de cobertura de inverno, o primeiro fator a ser considerado é de que houve o cultivo das plantas de cobertura de verão anteriormente a semeadura das plantas de cobertura de inverno. Não houve interação significativa entre as plantas de verão e inverno. Para a arilsulfatase e β-glucosidase não houve diferença entre os tratamentos.

Os solos cultivados com as diferentes plantas de cobertura de inverno apresentaram valores distintos para a atividade da fosfatase ácida, sendo que nos solos cultivados com vegetação espontânea, nabo forrageiro e aveia preta a atividade da fosfatase ácida teve maior influência da cobertura vegetal (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Atividade enzimática de solos cultivados com diferentes plantas de cobertura de inverno semeadas sob os solos cultivados anteriormente com culturas de verão. Setembro/2017.

Plantas de cobertura de inverno	Fosfatase ácida
	(µg p-nitrofenol h ⁻¹ g ⁻¹ solo)
Vegetação espontânea	671,20 a
<i>Vicia cracca</i>	558,19 b
<i>Raphanus sativus</i> L.	700,96 a
<i>Avena strigosa</i>	664,36 a
Mix	592,38 b

CV (%)	10,48
--------	-------

CV=coeficiente de variância.

A atividade da β -glucosidase dos solos cultivados com a área de vegetação espontânea, ervilhaca, aveia preta, nabo forrageiro e mix semeados no inverno, sob sucessão de crotalária, feijão guandu e uma área de vegetação espontânea do verão nas entrelinhas do cafeeiro mostrou significância para a interação entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Análise de desdobramento para a atividade da β -glucosidase no cultivo de plantas de cobertura semeadas no inverno sob a influência de solos cultivados anteriormente por plantas de cobertura semeadas no verão no cultivo das entrelinhas de café arábica, Patrocínio, MG.

de cobertura semeadas no verão no cultivo das entressafras de café arábica, Patrocinio, MG.					
Plantas de cobertura semeadas no verão/2017	Vegetação espontânea	Plantas de cobertura semeadas no inverno/2017			
		<i>Vicia cracca</i>	<i>Raphanus sativus L.</i>	<i>Avena strigosa</i>	Mix
β -glucosidase ($\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$)					
<i>Vegetação espontânea</i>	264,08 aA	-	-	-	-
<i>Crotalaria spectabilis</i>	-	210,01 aB	278,02 aA	269,72 aA	333,52 aA
<i>Cajanus cajan</i>	-	272,39 aA	305,46 aA	340,09 aA	258,05 bA
CV (%)			15,24		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. CV (%): coeficiente de variação.

4.3.2 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

A partir da análise de NMDS observa-se que os grupos do gene *rrs* (16S rRNA) bacteriano dos solos cultivados com as plantas de cobertura de verão se distanciam do grupo grupos do gene *rrs* (16S rRNA) bacteriano dos solos cultivados com plantas de cobertura de inverno (Figura 2.2) (Anosim $P \leq 0,001$). Indicando que as diferentes plantas de cobertura cultivadas no inverno e verão influenciam diretamente na estrutura da comunidade bacteriana do solo.

Figura 2.2. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) mostrando as diferenças entre os solos cultivados com diferentes plantas de cobertura do verão e do inverno baseado na análise de perfil de bactérias do gene *rrs* (16 sRNA). Os valores de estresse indicam a precisão no ajuste da ordenação: $0,1 \leq \text{Stresse} \leq 0,2$ = razoável; $0,05 \leq \text{Stress} \leq 0,1$ = bom; $\text{Stress} < 0,5$ = excelente.

Os resultados para a os solos cultivados com plantas de cobertura de verão obtidos em dois diferentes tempos (janeiro e abril/2017) mostram que existe distância entre as amostras de solos cultivados com crotalária e de feijão guandu avaliados em abril/2012, estes grupos estão com maior distância dos demais grupos, indicando que possivelmente o material vegetal aportado sobre o solo e a época de avaliação influenciam na comunidade microbiana do solo (Figura 2.3).

Figura 2.3. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) mostrando as diferenças entre os solos cultivados com diferentes plantas de cobertura do verão (março e abril/2017) baseado na análise de perfil de bactérias do gene *rrs* (16 sRNA). Os valores de

estresse indicam a precisão no ajuste da ordenação: $0,1 \leq \text{Stresse} \leq 0,2$ = razoável; $0,05 \leq \text{Stress} \leq 0,1$ = bom; $\text{Stress} < 0,5$ = excelente. Anosim $P \leq 0,001$.

Quando avaliado as plantas de cobertura de inverno, houve similaridade entre as áreas de controle, crotalária + aveia preta, crotalária + ervilhaca, crotalária + nabo forrageiro (Anosim $P \leq 0,001$) (Figura 2.4). A estrutura da comunidade bacteriana dos solos das áreas cultivadas no verão com crotalária e no inverno com outras plantas de cobertura (aveia preta, ervilhaca, nabo forrageiro e mix) não tem diferença em sua estrutura quando comparado aos demais tratamentos. Já a partir da distância existente na análise de escalonamento multidimensional realizada para os solos cultivados com feijão guandu no verão e com aveia preta, ervilhaca, nabo forrageiro e mix no inverno existe diferença entre a estrutura das comunidades bactérias do gene *rrs* 16S rRNA entre as áreas estudadas.

Figura 2.4. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) mostrando as diferenças entre os solos cultivados com diferentes plantas de cobertura no inverno baseado na análise de perfil de bactérias do gene *rrs* (16 sRNA). Os valores de estresse indicam a precisão no ajuste da ordenação: $0,1 \leq \text{Stresse} \leq 0,2$ = razoável; $0,05 \leq \text{Stress} \leq 0,1$ = bom; $\text{Stress} < 0,5$ = excelente. Anosim $P \leq 0,001$.

A cobertura vegetal utilizada nos solos influencia na mudança da estrutura da comunidade bacteriana (gene *rrs* 16 sRNA).

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

O feijão guandu apresentou maiores valores para a atividade enzimática da fosfatase ácida e para a arilsulfatase (Tabela 2.2). A biomassa microbiana representa um papel importante no processo de mineralização do fósforo orgânico do solo e de outros nutrientes, sendo os microrganismos os principais produtores das enzimas atuantes neste processo. Os autores Tejada et al. (2008) observaram aumento na atividade enzimática em solos com adição de adubos verdes, e atribuem este aumento a disponibilidade e ao tipo do material vegetal de origem e a facilidade de decomposição da fração vegetal aportada sob o solo.

Devido ao menor valor da relação C/N para feijão guandu e crotalária (21/1 e 23/1 respectivamente) quando comparado a área com vegetação espontânea composta por gramíneas (CARNEIRO et al., 2008), pode ocorrer deste material vegetal aportado no solo, ter causado um estímulo no aumento da atividade biológica e consequentemente a maior produção da fosfatase ácida. Além do mais, por meio do processo de mineralização, estas enzimas podem disponibilizar o P inorgânico aos vegetais e servirem como nutrientes as células microbianas, as quais podem se tornar um reservatório de P orgânico, disponibilizado no solo após a lise celular por meio do processo de mineralização (MONOKROUSOS et al., 2006).

O íon sulfato é a forma do enxofre absorvida pelas plantas, sendo este liberado a partir de fontes do enxofre orgânico por meio da atividade da enzima arilsulfatase, produzida por fungos, os principais microrganismos responsáveis por controlar o ciclo do enxofre, tornando-o disponível para as plantas (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2007). Desta maneira, a biomassa microbiana do solo tem papel fundamental no processo de mineralização e imobilização do enxofre, transformando-o em um íon assimilável para os vegetais bem como satisfazer as necessidades microbianas metabólicas por este elemento (CREGUT; RONDAGS, 2013).

A atividade da arilsulfatase não tem seus valores fixos de acordo com as propriedades físico-químicas dos solos, entretanto o carbono orgânico do solo pode influenciar nos picos de atividade enzimática máxima ou mínima, assim a atividade enzimática aumentará linearmente por causa do efeito do substrato (carbono orgânico do solo) e diminuirá concomitantemente com o decréscimo da matéria orgânica do solo e, se manterá constante após a saturação do substrato (CHEN et al., 2019). Entretanto, deve-se tomar cuidados com a interpretação de dados referentes a atividade enzimática da arilsulfatase, pois sua atividade sofre influência positiva pelo pH (quando o teor é menor do que 6,2) e pelo carbono orgânico do solo (quando o teor é inferior a 40 g C kg⁻¹), além de que o cálcio trocável presente no solo pode afetar indiretamente a atividade enzimática da arilsulfatase, por causa dos seus efeitos de modulação do pH ou da matéria orgânica do solo (adição aumenta o pH) (CHEN et al. 2019).

Dentro das épocas avaliadas para o cultivo de plantas de verão (março e abril/2017) houve maior valor da atividade biológica dos solos cultivados para o mês de abril (Tabela 2.3). Em abril, as plantas de cobertura de verão foram roçadas. O material vegetal recém roçado é fonte de energia para as comunidades microbianas do solo, qualquer mudança no teor e quantidade de material orgânico depositado no solo altera os processos microbianos e consequentemente a atividade biológica do solo (NYAWADE et al., 2019). A atividade enzimática da fosfatase e arilsulfatase foi influenciada pela época de amostragem do solo.

A atividade enzimática da fosfatase ácida mostrou maior sensibilidade para indicação de mudanças no uso de diferentes plantas de cobertura semeadas no inverno (Tabela 2.4). Já a arilsulfatase não mostrou diferença em sua atividade para as diferentes plantas de cobertura. A atividade da fosfatase ácida para as plantas *Raphanus sativus* L. $\geq$ vegetação espontânea $\geq$ *Avena strigosa* que foi maior quando comparado as demais plantas de cobertura.

Avaliando o efeito de plantas de cobertura micorrízicas e não micorrízicas sobre a atividade da fosfatase do solo e sua persistência nas safras subsequentes Kunze et al. (2011) descrevem que a atividade da fosfatase ácida foi maior no solo cultivado com nabo forrageiro e que foram significativamente maiores do que no solo em pousio com vegetação residente, os autores ainda afirmam que culturas de cobertura micorrízicas e não micorrízicas - como o nabo forrageiro, têm diferentes influências na dinâmica temporal da atividade da fosfatase no solo.

Alguns autores (BOSSE; KÖCK, 1998; NANAMORI et al., 2004; RENGEL; MARSCHNER, 2005; ROSOLEM; MERLIN; BULL, 2014) descrevem que a atividade da fosfatase ácida está associada a disponibilidade de fósforo inorgânico nos solos assim, estes autores afirmam que esta atividade enzimática diminui com a disponibilidade de fósforo inorgânico no solo. Entretanto Yan et al. (2001) descrevem que a atividade desta enzima não está relacionada com a baixa disponibilidade de fósforo nos solos, corroborando com este resultado, no qual a quantidade de fósforo nos solos é adequada para os cultivos (Tabela 2.1), não evidenciando deficiência de fontes de fosfatos para as plantas. Além disso Nunes et al. (2008) descrevem que a atividade da fosfatase ácida decresceu com a idade de *Urochloa decumbens* e *Panicum maximum* cv. Tanzânia. Isso mostra que a atividade enzimática da fosfatase ácida está relacionada a diferentes fatores de nutrição do solo e ao manejo das plantas.

Os solos de vegetação espontânea foram constituídos por gramíneas, para Brandana et al. (2017) o uso de gramínea como a braquiária, favorece a atividade microbiana do solo graças a arquitetura abundante e expansiva de seu sistema radicular, além de que favorecem as características químicas, físicas e estimularam a atividade de enzimas microbiana do solo.

Para a β -glucosidase houve influência das plantas de cobertura semeadas no verão em solos cultivados com plantas de cobertura semeadas no inverno (Tabela 2.5). A atividade enzimática da β -glucosidase foi mais sensível quando comparadas as demais enzimas, mostrando o efeito da mudança do manejo nas entrelinhas do cafeeiro, corroborando com Chaer e Tótola (2007), no qual os autores descrevem sobre uma maior sensibilidade na detecção do manejo ambiental em áreas cultivadas com eucalipto. Além do mais, o aumento do carbono mineralizável, proveniente das plantas de cobertura antecessoras e subsequentes influenciou na atividade enzimática da β -glucosidase, bem como a interação entre as plantas de cobertura (LISBOA et al., 2012).

A partir dos dados obtidos é possível inferir que a diversidade de plantas semeadas na área cultiva com um mix de sementes (nabo forrageiro + aveia preta + ervilhaca), sobre solo cultivado anteriormente com crotalária, proporcionou maior atividade enzimática para a β -glucosidase, afirmando novamente a relação benéfica da diversidade vegetal sobre a atividade desta enzima (Tabela 2.5). Por se tratar de um manejo onde o solo recebe frações vegetais provenientes das plantas de cobertura, e por ser uma enzima atuante na etapa final do processo de decomposição vegetal, mais especificamente na hidrólise dos resíduos de celulose, a β -glucosidase tem influência sobre a qualidade do solo, sendo está também influenciada pelo material vegetal aportado sobre o mesmo (TABATABAI, 1994; PASSOS et al., 2008).

O cultivo de plantas de cobertura durante o período de inverno aumenta a importância das interações microbianas na ciclagem de nutrientes, principalmente em sistemas que proporcionem uma maior quantidade de resíduos depositados na superfície do solo, contribuindo para o aumentando o nível de nutriente armazenados no solo, no aumento do carbono da comunidade microbiana e na atividade enzimática microbiana do solo (TIECHERA; DOS SANTOS; CALEGARI, 2012).

4.4.2 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

Os resultados para a estrutura da comunidade microbiana de genes *rrs* (16S rRNA) mostram que os resíduos vegetais aportados sobre os solos cultivados no verão têm influência na comunidade microbiana de solos cultivados com plantas de cobertura no inverno.

As mudanças no uso e manejo do solo pode modular seu microbioma, interferindo nas populações microbianas, no número total de microrganismos, biomassa, taxas de respiração e atividades enzimáticas (KENNEDY; SMITH, 1995). A figura 2.3 mostra que existe distância

entre os tratamentos, indicando diferenças entre os grupos microbianos. As plantas de cobertura avaliadas no verão têm características de porte aéreo e sistema radicular semelhantes, além de que são plantas da mesma família e com relação carbono / nitrogênio baixa (PERIN et al., 2010), entretanto ainda assim mostram um comportamento distinto para a estrutura da comunidade bacteriana.

As plantas de cobertura do inverno proporcionaram maior dissimilaridade entre os tratamentos de solos cultivados anteriormente no verão com crotalária e feijão guandu e no inverno com plantas da família Fabaceae, Poaceae e Brassicaceae (Figura 2.4). Indicando que as diferentes plantas de cobertura utilizadas modulam a estrutura da comunidade de bactérias (gene *rrs* 16S rRNA). Com o tempo, as práticas de cultivo de uso de plantas de cobertura têm um impacto na comunidade bacteriana do solo, especialmente aquelas que alteram as propriedades químicas e físicas do solo (CHAMBERLAIN et al., 2020).

4.5 CONCLUSÃO

A avaliação de bioindicadores biológicos mostrou maior sensibilidade na detecção de mudanças de manejo do solo.

As plantas de coberturas antecessoras ao cultivo de plantas de cobertura semeadas no inverno não mostraram influência para a atividade enzimática da fosfatase ácida e da arilsulfatase, mas interferiram diretamente na atividade da β -glucosidase. A atividade da β -glucosidase é influenciada pelos restos de frações orgânicas de cultivos anteriores.

Verificou-se que o uso de plantas de coberturas nas entrelinhas do cafeeiro arábica e que as épocas de avaliação têm impacto na estrutura da comunidade bacteriana. As frações vegetais aportadas sobre os solos modulam a estrutura da comunidade bacteriana.

Os resíduos vegetais aportados sobre os solos cultivados no verão têm influência na comunidade microbiana de solos cultivados com plantas de cobertura no inverno.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CRUZ, L.; SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D.; PÉREZ-ALEGRÍA, L. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. **Applied Soil Ecology**, v.35, p.35–45, 2007.
- ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do solo**. 2ª Edição. Piracicaba, ESALQ. 2016, 225p.

- ALVARENGA, R.C.; LARA CABEZAS, W.A.; CRUZ, J.C.; SANTANA, D. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informativo Agropecuário**, v. 22, p.25-36, 2001.
- BOSSE, D.; KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. **Plant Cell Environment**, 21:325-332, 1998.
- BRANDANA, C. P.; CHAVARRÍA, D.; HUIDOBRO, J.; MERILES, J. M.; BRANDAN, C. P.; GIL, S. V. Influence of a tropical grass (*Brachiaria brizantha* cv. Mulato) as cover crop on soil biochemical properties in a degraded agricultural soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 83, p. 84-90, 2017.
- CARNEIRO, M. A. C.; CORDEIRO, M. A. S.; ASSIS, P. C. R.; MORAES, E. S.; PEREIRA, H. S.; PAULINO, H. B.; SOUZA, E. D. DE. Produção de fitomassa de diferentes espécies de cobertura e suas alterações na atividade microbiana de solo de cerrado. **Bragantia**, v.67, p.455-462, 2008.
- CHAER, G.M.; TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1381-1396, 2007.
- CHAMBERLAIN, L. A.; BOLTON, M. L.; COX, M. S.; SUEN, G.; CONLEY, S. P.; ANÉ, J.-M. Crop rotation, but not cover crops, influenced soil bacterial community composition in a corn-soybean system in southern Wisconsin. **Applied Soil Ecology**, v. 154, p. 1-9, 2020.
- CHEN, H.; LIU, J.; LIU, D.; XIAO, K.; WANG, K. Controls on soil arylsulfatase activity at a regional scale. **European Journal of Soil Biology**, v. 90, p. 9-14, 2019.
- CHEN, Y.; GENG, Y.; HUANG, J.; CUI, X.; HOU, M. Differences of soil enzyme activities and their influencing factors under different flooding conditions in bird island area of Qinghai Lake. **Chinese Journal of Ecology**, v. 38, p. 735–743, 2019.
- CREGUT, M.; RONDAGS, E. New insights in agar biorefinery with arylsulphatase activities. **Process Biochem**, v.48, p.1861–1871, 2013.
- DUFRANC, G.; DECHENS, S. C. F.; FREITAS, S. S.; CAMARGO, O. A. Atributos físicos, químicos e biológicos relacionados com a estabilidade de agregados de dois latossolos em plantio direto no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, 2004, p. 505-517.
- EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLOCKER, H.; EMDE, M.; BOTTGER, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 7843–7853, 1989.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Revista Ciência Agrotécnica**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- GUIMARÃES, N. DE F.; GALLO, A. DE S.; FONTANETTI, A.; MENEGHIN, S. P.; SOUZA, M. D. B. DE; MORINIGO, K. P. G.; SILVA, R. F. DA. Biomassa e atividade microbiana do solo em diferentes sistemas de cultivo do cafeeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, p.34-44, 2017.
- KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant Soil**, v. 170, p. 75-86, 1995.
- KUNZE, A.; COSTA, M. D.; EPPING, J.; LOFFAGUEN, J. C.; SCHUH, R.; LOVATO, P. E. Atividade de fosfatase em solo arenoso influenciada por coberturas micorrízicas e não micorrízicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 705-711, 2011.
- LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 82, p. 6955–6959, 1985.
- LEITE, J. N. F.; CRUZ, M. C. P. DA; FERREIRA, M. E.; ANDRIOLI, I.; BRAOS, L. B. Frações orgânicas e inorgânicas do fósforo no solo influenciadas por plantas de cobertura

- e adubação nitrogenada. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.51, p.1880-1889, 2016.
- LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, A.O.D.; MARTINS, A.F.; SELBACH, P.A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.36, p.33-44, 2012.
- LUO, X.; FU, X.; YANG, Y.; CAI, P.; PENG, S.; CHEN, W.; HUANG, Q. Microbial communities play important roles in modulating paddy soil fertility. **Scientific Reports**, v.6, p. 1-12, 2016.
- MONOKROUSOS, N.; PAPATHEODOROU, E.M.; DIAMANTOPOULOS, J.D.; STAMOU, G.P. Soil quality variables in organically and conventionally cultivated field sites. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1282– 1289, 2006.
- NANAMORI, M.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I.M.; OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar mulato compared with rice. **Plant Cell Physiology**, 45:460-469, 2004.
- NUNES, F. N.; CANTARUTTI, R. B.; NOVAIS, R. F.; DA SILVA, R.; TÓTOLA, M. R.; RIBEIRO, B. N. Phosphatase activity in forage grasses as influenced by soil phosphorus availability and plant cutting height. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1899-1909, 2008.
- NYAWADEA, S. O.; KARANJA, N. N.; GACHENE, C. K. K.; GITARI, H. I.; SCHULTE-GELDERMANN, E.; PARKERA, M. L. Short-term dynamics of soil organic matter fractions and microbial activity in smallholder potato-legume intercropping systems. **Applied Soil Ecology**, v. 142, p. 123-135, 20219.
- PAULO, E. M.; BERTON, R. S.; CAVICHIOLI, J. C.; BULISANI, E. A.; KASAI, F. S. Produtividade do café apoatã em consórcio com leguminosas na região da alta paulista. **Bragantia**, v.60, p.195-199, 2001.
- PASSOS, S. R.; REIS JUNIOR, F. B. DOS; RUMJANEK, N. G.; MENDES, I. DE C.; BAPTISTA, M. J.; XAVIER, G. R. Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.879-885, 2008.
- PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; CABALLERO, S. S. U.; GUERRA, J. G. M.; GUSMÃO, L. A. Acúmulo e liberação de P, K, Ca e Mg em crotalária e milho solteiros e consorciados. **Revista Ceres**, v. 57, p. 274-281, 2010.
- RENGEL, Z.; MARSCHNER, P. Disponibilidade e gestão de nutrientes na rizosfera: explorando diferenças genótípicas. **New Phytologist**, v. 168, p. 305-312, 2005.
- ROSOLEM, C. A.; MERLIN, A.; BULL, J. C. L. Soil phosphorus dynamics as affected by Congo grass and P fertilizer. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 309-315, 2014.
- SILVA, E. M. DA; MALVINO, S. S. A. B. Análise climática do município de Patrocínio (MG). **Caminhos de Geografia**, v.16, p.93-108, 2005.
- TABATABAI, M. A. 1994. **Soil enzymes**. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties. Page AL, Miller EM, Keeney DR (eds). American Society of Agronomy, Madison, v.1, p.903-947.
- TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A. M.; PARRADO, J. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. **Bioresource Technology**, v.99, p.1758-1767, 2008.
- TIECHERA, T.; DOS SANTOS, D. R.; CALEGARI, A. Soil organic phosphorus forms under different soil management systems and winter crops, in a long term experimente. **Soil and Tillage Research**, v.124, p. 57-67, 2012.
- VILELA, E. F.; FREITAS, M. R. C.; PIANO, P. B.; SANTOS, R. H. S.; MENDONÇA, E. DE S. Crescimento inicial de cafeeiros e fertilidade do solo adubado com mucuna, amendoim forrageiro ou sulfato de amônio. **Coffee Science**, v. 6, p. 27-35, 2011.

YAN, X.; LIAO, H.; TRULL, M.C.; BEEBE, S.E; LYNCH, J.P. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. **Plant Physiology**, v.125, p.1901-1911, 2001.

INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE DEFENSIVOS QUÍMICOS EMPREGADOS NO CULTIVO DO CAFÉ SOBRE A DIVERSIDADE E A ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO

Resumo

É indiscutível a importância dos defensivos químicos na maioria dos sistemas de produção adotados atualmente na agricultura. No entanto, pouco se conhece sobre a interação entre os defensivos químicos e a diversidade e a atividade biológica do solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes defensivos aplicados via solo no manejo de café sobre a atividade, a abundância e a estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo. O experimento foi conduzido em microcosmos, utilizando a fração superficial (0,0 – 0,10 m) de um Latossolo Vermelho distrófico. Cada microcosmo caracteriza-se por uma fração de 50 g de solo, incubados em condições de laboratório e delineados em um experimento casualizado em esquema fatorial 8 x 3, constituído por 7 defensivos e um tratamento controle, com 3 aplicações ao longo do tempo, e 3 repetições. Os parâmetros avaliados 10 dias após cada uma das aplicações dos defensivos foram: atividade enzimática da arilsulfatase, β -glucosidase, fosfatase ácida, a quantificação total do número de cópias de genes bacterianos *rrs* (16S rRNA) em tempo real e a estrutura da comunidade fúngica e bacteriana. Cada enzima mostrou um comportamento distinto para avaliação dos efeitos dos defensivos aplicados via solo. A atividade enzimática é um bom indicador bioquímico para a biodegradação de defensivos utilizados no café via solo. Os resultados indicam que os defensivos químicos possuem propriedades químicas e físicas particulares que determinam seu comportamento de dissipação e degradação no solo, no qual cada enzima mostra um comportamento distinto para avaliação do efeito de defensivos aplicados. A atividade enzimática é um bom indicador bioquímico para a biodegradação de defensivos químicos utilizados no café, além disto a estrutura da comunidade bacteriana apresentou variações durante após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.;Inseticida;Fungicida;Herbicida; Atributos microbiológicos

Abstract

INFLUENCE OF THE APPLICATION OF SOIL DEFENSIVE AGENTS ON COFFEE CROP DIVERSITY AND SOIL MICROBIAN ACTIVITY

The importance of chemical pesticides in most production systems currently adopted in agriculture is unquestionable. However, little is known about the interaction between chemical pesticides and soil biological diversity and activity. This work aimed to evaluate the effect of different pesticides applied via soil in the management of coffee on the activity, abundance and structure of soil bacterial and fungal communities. The experiment was carried out in microcosms, using the surface fraction (0.0 – 0.10 m) of a dystrophic Red Latosol. Each microcosm is characterized by a fraction of 50 g of soil, incubated under laboratory conditions and designed in a randomized experiment in an 8 x 3 factorial scheme, consisting of 7 pesticides and a control treatment, with 3 applications over time, and 3 reps. The parameters evaluated 10 days after each of the pesticide applications were: enzymatic activity of arylsulfatase, β -glucosidase, acid phosphatase, the total quantification of the copy number of bacterial genes *rrs* (16S rRNA) in real time and the fungal community structure and bacterial. Each enzyme showed a different behavior for evaluating the effects of pesticides applied via soil. The enzymatic activity is a good biochemical indicator for the biodegradation of pesticides used in coffee via soil. The results indicate that chemical pesticides have particular chemical and physical properties that determine their behavior of dissipation and degradation in the soil, in

which each enzyme shows a different behavior for evaluating the effect of applied pesticides. The enzymatic activity is a good biochemical indicator for the biodegradation of chemical pesticides used in coffee, in addition the bacterial community structure showed variations during 10, 30 and 50 days after the first application.

Keywords: *Coffea arabica* L.; Insecticide ; Fungicide ; Herbicide ; Microbiological attributes

5.1 Introdução

O café ocupa uma posição de destaque na balança comercial brasileira por muitas décadas, se tornando uma das *commodities* mais importantes do Brasil. Estima-se que o Brasil produza 58 milhões de sacas beneficiadas, com área total em formação e em produção de 2.168,6 mil hectares, sendo o Estado de Minas Gerais o maior produtor de café arábica (*Coffea arabica* L.) do país, produzindo para safra 2018 30.698,2 mil sacas de café. Em relação a produção de café conilon (*Coffea canéfora* L.) o Estado do Espírito Santo é o maior produtor, com uma estimativa de produção de café de 12.814 mil sacas, sendo 4.507 mil sacas correspondente ao café arábica e 8.307 sacas de café conilon (CONAB, 2018), sendo esta cultura a responsável por grande demanda social e econômica no país.

Para atingir altas produtividades, a cultura do café requer aplicações, de modo geral, de vários produtos para o controle de plantas daninhas, pragas e doenças. Em relação a competição a competição com plantas daninhas, o cafeeiro é uma planta muito sensível, requerendo controle eficiente. Estima-se que a competição por plantas invasoras reduz 50% da disponibilidade do teor de macronutrientes no solo e que em plantas jovens o desenvolvimento vegetal pode ser reduzido em até 41% (ALCÂNTARA et al., 2009; CARVALHO et al., 2013). Outros fatores como a incidência de doenças, dentre elas a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. et Cooke.) e outras, bem como a presença de pragas, principalmente o bicho-mineiro, ácaros e cochonilhas, são fatores que também tem grande potencial para a redução da produtividade e da qualidade do café, e consequentemente aumentar o custo de produção (CARVALHO et al., 2012).

Na tentativa de evitar prejuízos na produtividade de café, o cafeicultor brasileiro tem utilizado intensivamente defensivos químicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas), sendo o solo seu destino final, tanto para aplicação direta no solo ou aplicação indireta por meio da parte aérea dos vegetais (MANCUSO et al., 2011). Para Castro (1999), o efeito residual de um defensivo surge em função da natureza físico-química e/ou biológica, da formulação ou da

quantidade aplicada do produto no solo, direta e/ou indiretamente, sendo que as propriedades do solo podem ser modificadas pelos produtos resultantes da decomposição/degradação ou transformação do defensivos químicos no solo (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2011).

No solo, os microrganismos, como as bactérias e fungos, são os principais agentes degradadores das moléculas químicas presentes nos herbicidas, fungicidas e inseticidas. Devido as moléculas químicas destes produtos conterem nitrogênio, fósforo, sulfato, carbono e dentre outras moléculas energéticas, os microrganismos do solo podem utiliza-las como fonte de energia para sua manutenção no solo (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011; PIERZYNSKI et al., 1994). Entretanto, a aplicação dos defensivos químicos pode influenciar na comunidade microbiana do solo tanto positivamente quanto negativamente, como descrito por Andrighetti et al. (2014), no qual a aplicação de glifosato modulou a atividade microbiana, diminuindo a multiplicação de bactérias em solos contaminados, sendo a molécula concomitantemente degradada por fungos e actinobactérias.

Dentro deste contexto, o trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de defensivos químicos utilizados no manejo de café via solo na atividade enzimática e na estrutura da comunidade microbiana do solo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Caracterização experimental

O experimento foi conduzido em microcosmos, no Laboratório de Microbiologia do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Esalq/USP). Utilizou-se um Latossolo Vermelho distrófico pertencente a uma área cultivada com *Urochloa* spp. (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Caracterização química e granulométrica do solo padrão. Piracicaba, SP.

pH	MO	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Argila	Silte	Areia
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³									
5,4	22	<3	18	<0,9	11	7	<2	15	176	82	742

pH= potencial hidrogeniônico; MO= matéria orgânica do solo; P= fósforo; K= potássio; Ca= cálcio; Mg= magnésio; Al= alumínio; H+Al= hidrogênio + alumínio.

Os microcosmos foram compostos por uma fração de 50 g de solo, alocados em um frasco com dimensão de 0,045 x 0,045 m, com área total de 0,002 m² (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Imagem do microcosmo utilizado no experimento.

O preparo do microcosmo foi realizado por meio da alocação das frações de solo, umedecidos com 5 mL de água, seguindo por incubação a temperatura ambiente (27°C) por 10 dias, promovendo a estabilização das amostras anteriormente a implantação dos tratamentos. Posteriormente, em cada um dos microcosmos foram adicionadas 2 mL de água destilada contendo a dose recomendada de cada defensivo, na dosagem equivalente a área total do microcosmo e a quantidade de solo utilizado. Desta maneira, preparou-se soluções contendo 3 µl de glifosato; 6 µl de oxifluorfem; 0,003 g de clorimurom etílico; 1 µl de tebuconazol e trifloxistrobina; 3 µl de imidacloprido e flutriafol; 0,02 g de tiametoxam; e, 1,5 µl de clorpirifós em 10 mL de água destilada. Para os microcosmos controle foram aplicados 2 mL de água destilada. As doses utilizadas foram calculadas com base nas doses recomendadas pelo fabricante para a cultura do café (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Dose do produto comercial recomendada para aplicação no manejo de plantas daninhas, insetos e fungos no cultivo do café e dose utilizada nas avaliações em solo padrão.

Agroquímico	Dose produto comercial / 10000 m ²		Dose utilizada / 0,002 m ²	
	L/ha	g/ha	L/ha	g/ha
Glifosato	3,0	-----	3,0	-----
Oxifluorfem	2,0 - 6,0	-----	6,0	-----
Clorimurom etílico		50,0 – 80,0	-----	80,0
Tebuconazol e trifloxistrobina	0,75 – 1,00	-----	-----	-----
Imidacloprido e flutriafol	2,0 – 3,0	-----	3,0	-----
Tiametoxam		1200 a 2000	-----	2000
Clorpirifós	1,0 - 1,5	-----	-----	1,5

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 x 3, sendo constituído por 8 tratamentos, sendo 7 defensivos e um tratamento controle utilizando-se de água, com três repetições cada. Foram realizadas três aplicações: a primeira aplicação após 10

dias de descanso do solo umedecido com água, a segunda aplicação após 30 dias da primeira aplicação e a terceira aplicação após 50 dias da primeira aplicação.

5.2.2 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Para a avaliação do efeito da aplicação dos defensivos, foram avaliadas a atividade enzimática da fosfatase ácida, β -glucosidase e da arilsulfatase após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação dos defensivos nos solos. A metodologia empregada para avaliação enzimática foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tabatabai (1994).

Para a análise dos bioindicadores os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias para os resultados foram realizadas utilizando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software SISVAR (FERREIRA, 2011).

5.2.3 Extração de DNA dos solos

A extração de DNA total do solo foi realizada com o kit comercial *PowewSoil*[®] DNA (Mobio Laboratories), seguindo as instruções do fabricante, utilizando 0,4 g de solo. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1 % (w/v), com solução tampão TAE 1X (tris-acetato-EDTA) juntamente com o marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1 kb* (Invitrogen) e 2 μ l do padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). A eletroforese foi realizada a 10V.cm⁻¹, corada com solução de *GelRed*TM 1000x e foto documentada em luz ultravioleta pelo *ImageQuant TL* software program (GE Healthcare Life Sciences), após a extração os DNAs foram armazenados a -20°C para uso posterior.

5.2.4 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) e do gene fúngico ITS 18S rRNA de cada amostra de solo foi estimada por meio de reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o aparelho *Real-Time PCR System StepOne*, com o sistema SYBR Green I.

As reações para a comunidade bacteriana foram realizadas em um volume final de 20 μ l, contendo: 10 μ L de *SYBER*[®] *Green PCR MasterMix* (*Live Technologies*TM), 0,25 pmol de iniciadores P1 (5' -CCT ACG GGA GGC AGC AGC AG-3') e P2 (5' -ATT ACC GCG GCT

GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993), 0,15 Bovine Serum Albumin (Roche®) e 1 µl de DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante 30 s. Para verificar a especificidade da amplificação, as curvas de desnaturação foram realizadas com temperaturas crescentes, a partir de 60°C e chegando a 95°C.

Já para a comunidade fúngica as reações em tempo real foram realizadas em volume de 25 µl, contendo 12,5 µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil) e os primers ITS1f (5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3') e 5,8 s (5' – CGC TGC GTT CTT CAT CG – 3') na concentração de 100 nM (FIERER et al., 2009). Os ciclos de amplificações foram iniciados com desnaturação a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 30 s; 53°C por 30 s e 72°C por 1 min, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 45 s (FIERER et al., 2009). Uma curva de desnaturação foi realizada ao final para todas as reações a uma temperatura entre 72° à 96°C para verificar a especificidade da amplificação.

As estimativas de quantificação de log do número de cópias do gene 16S rRNA por grama de solo foram calculados comparando os valores de Ct obtidos com os da curva padrão previamente construída com produtos de clones. Com isto, foi determinado a eficiência da quantificação, bem como o valor de regressão logarítmica das diluições utilizadas (R^2).

Os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias para os resultados foram realizadas utilizando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no software SISVAR (FERREIRA, 2011).

5.2.5 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

Esta análise foi realizada para o estudo das comunidades de bactérias para verificar o efeito da aplicação de defensivos químicos na estrutura da comunidade microbiana do solo ao longo do tempo (após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação dos defensivos nos solos).

A estrutura da comunidade bacteriana foi acessada por meio do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). A amplificação do gene alvo de bactérias, o *rrs* (16S rRNA), foi realizada usando os iniciadores 8-FM (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) (SCHUTTE et al., 2009) e 926r (5' - CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT -3') (LANE et al., 1985; SCHUTTE et al., 2009).

Os ciclos das reações foram iniciados com a desnaturação a 95°C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e uma extensão final de 72°C por 10 min. O volume final das reações foi de 50 µL, contendo 6 µL de $MgCl_2^+$ (concentração final de Mg^{2+} de 3 mM), 0,2 µL (equivalente a 1U) de “Taq” polimerase, 5 µL do tampão livre de Mg^{2+} para “Taq” polimerase (100 mM Tris-Cl (pH 8,8), 500 mM KCl, 1 % Triton-X-100) (Sinapse Inc, São Paulo, Brasil), 4 µL de “Deoxynucleoside Triphosphate” (dNTP) (0,2 mM de cada base nitrogenada), 0,1 µL de cada iniciador (0,01 mM) (8-FM e 926r, previamente mencionados), e 1 µL de DNA molde, completando com 33,6 µL de água ultrapura autoclavada. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

A qualidade das reações foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corrido em 90 V por 60 min em tampão de tris-acetato-EDTA (TAE 1x) utilizando 5 µL do produto de PCR corado com GelRed™ (0,5 µg mL⁻¹), visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados com adição de 200 µL de álcool isopropílico P.A (PM = 60,1) por amostra, seguido por incubação por 2 horas à -20 °C e centrifugação a 4000 rpm por 90 min a 4 °C.

Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 250 µL de álcool etílico absoluto (70%) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras nas condições supracitadas. O sobrenadante foi descartado e as amostras centrifugadas invertidas até atingir a rotação de 250 rpm. Ressuspendeu-se as amostras com 25 µL de água ultrapura autoclavada e acondicionou-se em freezer a -20 °C e a qualidade da purificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 2 % após um período de 8 horas de hidratação. O volume final das reações de digestão (clivagens) foi de 20 µL, contendo 10 µL do produto de PCR purificado (aproximadamente 100 ng), 2,0 µL do tampão da enzima (10X Buffer Tango), 0,5 µL da enzima Anza™ 59Hha I (5 U) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) completando com 7,5 µL de água ultrapura e mantidos em 37 °C por 3 horas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies).

Logo após estes produtos foram precipitados adicionando para cada amostra, 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de acetado de sódio 3 M e 50 µL de álcool etílico absoluto P.A e deixado em repouso por 15 min seguido de centrifugação a 2128 rpm por 30 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 70 µL de álcool etílico absoluto (70%) em cada amostra e centrifugou novamente as amostras por 20 min a 2128 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas ao ar por 40 min. Logo após as amostras foram resuspendidas usando formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Life Technologies) com

marcador GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems, Life Technologies) e analisadas em um sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies). Os resultados foram processados usando o software GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies), com uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras.

Os resultados para o T-RFLP foram obtidos somente para o gene bacteriano *rrs* (16S rRNA), os mesmos foram exportados de uma tabela da área de picos e os padrões agrupados usando análise de coordenadas principais (PCoA) no programa R 2.15.1 (Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing. As figuras de análises de coordenadas principais (PCoA), foram geradas utilizando a ferramenta estatística do Sftware RStudio, com o pacote “Vegan”. Também foi realizado análise de Similaridade (ANOSIM).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

Ao longo do experimento foi possível verificar alterações nas atividades microbianas nas amostras que receberam os defensivos, quando comparadas ao tratamento controle.

Atividade enzimática avaliada ao longo do tempo, sendo realizado o desdobramento dos fatores qualitativos e quantitativos. Aos 10 dias após a primeira aplicação, foi observado que o tratamento com glifosato mostrou maior atividade para as três enzimas avaliadas (Tabela 3.3). Já aos 30 e 50 dias após a primeira aplicação de glifosato o comportamento da atividade para as enzimas avaliadas não segue um mesmo padrão, indicando que cada enzima responde a aplicação dos defensivos químicos de forma diferenciada.

Tabela 3.3 - Valores médios para fosfatase ácida, β -glucosidase e arilsulfatase após a aplicação de defensivos químicos (DQ) via solo.

DQ	Arilsulfatase			Fosfatase ácida ($\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$)			β -glucosidase		
	10	30	50	10	30	50	10	30	50
	Dias após a primeira aplicação								
Água	31 b	30, b	53 a	309 a	585 a	375 a	36 b	47 b	35 a
Glifosato	49 a	42 a	40 b	343 a	427 b	362 a	49 a	58 a	44 a
Clorpirifós	27 b	24 b	40 b	290 b	332 c	298 b	32 b	41 c	30 a
Tiametoxam	31 b	28 b	41 b	281 b	338 b	347 a	37 b	45 b	38 a
Oxifluorfem	30 b	27 b	28 c	285 b	322 c	322 b	30 b	48 b	29 a
Clorimurom etilico	32 b	26 b	38 b	311 a	332 c	336 b	38 b	57 a	33 a
Tebuconazol e trifloxistrobina	28 b	26 b	40 b	271 b	314 b	374 a	38 b	39 c	35 a
Imidacloprido e flutriafol	34b	31 b	47 a	200 c	346 c	361 a	29 b	37 c	36 a
CV (%)	11,31			7,69			13,42		

*Letras minúsculas na coluna não diferem entre si.

A partir da análise de desdobramento da atividade enzimática da arilsulfatase, utilizando regressões em função dos dias de avaliação, pode-se verificar que os fungicidas e inseticidas apresentaram a mesma tendência linear crescente (Figura 3.3), que acompanha o observado no tratamento controle. Os herbicidas utilizados apresentaram comportamento distintos dos fungicidas e inseticidas, sendo que o glifosato provoca a diminuição da atividade da arilsulfatase ao longo das aplicações e o clorimurom etílico provoca - após a primeira aplicação, a diminuição da atividade enzimática seguida de aumento após a terceira aplicação, ajustando-se somente a equação de segundo grau (Figura 3.3). Não houve ajuste das equações para análise

de desdobramento em função dos dias de avaliação para atividade enzimática da arilsulfatase para o oxifluorfem.

Figura 3.3 - Análise de desdobramento da atividade enzimática da arilsulfatase em função da avaliação ao longo do tempo.

O efeito da aplicação de diferentes defensivos via solo para a atividade da β -glucosidase mostra efeito inverso quando comparado a atividade da arilsulfatase, sua atividade mostra aumento após a primeira aplicação das doses recomendadas, seguida pela queda da atividade enzimática após a segunda aplicação. Não houve ajuste para as equações de primeiro e segundo grau para a atividade da β -glucosidase quando utilizado tiametoxam, tebuconazol e trifloxistrobina e, imidacloprido e flutriafol (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Análise de desdobramento da atividade enzimática da β -glucosidase em função da avaliação ao longo do tempo.

Para a atividade da fosfatase ácida os herbicidas clorimuirom etílico e oxifluorfem não se ajustaram às equações, enquanto que o glifosato mostrou aumento em sua atividade enzimática após a primeira aplicação via solo, seguida da diminuição da atividade enzimática após a segunda aplicação (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Análise de desdobramento da atividade enzimática da fosfatase ácida em função da avaliação ao longo do tempo.

O comportamento da atividade da fosfatase ácida pela aplicação via solo de clorpirifós, água, glifosato e tebuconazol e trifloxistrobina são influenciados após a primeira aplicação, no qual ao longo dos 30 primeiros dias a atividade aumenta seguida de um decaimento após a segunda aplicação, indicando que ao longo do tempo sua atividade diminui. Comportamento distinto para o tiametoxam, este por sua vez influenciou o aumento ao longo do tempo da atividade da fosfatase ácida (Figura 3.5).

5.3.2 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação das comunidades microbianas foi realizada somente ao final do experimento. Para a abundância do gene *rrs* que codifica o 16s rRNA bacteriano não houve

diferença significativa ($Pr < Fc 0,05$) com valores variando entre $7,82E+10$ e $9,92E+10E$, enquanto que para a abundância de fungos do gene ITS codificador do gene 18S rRNA foi verificado efeito para os tratamentos com os produtos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Teste Scott-Knott para o gene *rrs* que codifica o 16s do rRNA bacteriano e para o gene ITS codificador do gene 18S rRNA em função da aplicação de diferentes defensivos químicos no solo.

Defensivos	log n° cópias do gene <i>rrs</i> codificador do 16s / grama solo	log n° cópias do gene ITS codificador do gene 18S rRNA / grama solo
Água	7,82E+10 a	1,43E+07 b
Glifosato	9,44E+10 a	1,87E+07 a
Clorpirifós	9,49E+10 a	1,29E+07 b
Tiametoxam	9,92E+10 a	1,75E+07 a
Oxifluorfem	8,20E+10 a	8,537E+06 c
Clorimurom etílico	8,39E+10 a	1,44E+07 b
Tebuconazol e trifloxistrobina	9,42E+10 a	1,69E+07 a
Imidacloprido e flutriafol	9,08E+10 a	1,96E+07 a
CV (%)	12,86	16,26

*Letras minúsculas na coluna não diferem entre si. 5% de probabilidade no teste de Skott Knott.

5.3.3 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

A análise dos componentes principais para estrutura da comunidade bacteriana do solo em função da aplicação de diferentes defensivos químicos após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação mostra que existe uma separação distinta entre os tempos avaliados ao longo do primeiro eixo (48,7%) e do segundo eixo (33,1 %), indicando que a aplicação promove modificações na estrutura da comunidade microbiana do solo (Figura 3.6). A combinação dos eixos 1 e 2 mostram um percentual de 81,8% de variabilidade total.

Figura 3.6. Biplot da análise de componentes principais (PCA) das estruturas genéticas do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) em função da aplicação após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação. T10= avaliação feita após 10 dias da primeira aplicação. T30= avaliação feita após 30 dias da primeira aplicação. T50= avaliação feita após 50 dias da primeira aplicação.

Quando avaliado cada tempo em função da aplicação de diferentes defensivos químicos após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação em separado, o primeiro eixo da análise de componentes principais explica os dados em 58,6, 49,2 e 66,5% respectivamente em sua maior variância (Figura 3.7ABC).

O glifosato apresentou separação distinta para após 10 e 30 dias de aplicação no solo (Figura 3.7AB). Observa-se um agrupamento distinto ao longo do tempo para as enzimas avaliadas, assim a atividade da arilsulfatase em função da aplicação de diferentes defensivos químicos após 10 dias da primeira aplicação dos defensivos no solo se correlaciona negativamente com a atividade enzimática da β -glucosidase e da fosfatase ácida, já após 30 e 50 dias da primeira aplicação dos defensivos no solo o comportamento é distinto, no qual a atividade da β -glucosidase mostra uma correlação negativa com as demais enzimas avaliadas (Figura 3.7ABC).

Figura 3.7. Análise de coordenadas principais (PCA) das estruturas genéticas do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) em função da aplicação de diferentes defensivos químicos após 10 (A), 30 (B) e 50 (C) dias da primeira aplicação.

Quando comparado com a fosfatase ácida, a arilsulfatase e a β-glucosidase foram mais sensíveis a aplicações dos defensivos químicos, indicando que estas enzimas podem ser utilizadas para medir parâmetros de mudanças em decorrência do manejo do solo. Os microcosmos tratados não mostraram padrões de agrupamento claro para a estrutura da comunidade bacteriana (gene *rrs* 16S rRNA), no entanto foi observado mudanças ao longo do tempo nos microcosmos tratados.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Avaliação da atividade biológica do solo por meio de bioindicadores

A alta atividade enzimática da arilsulfatase obtida aos 10 dias após a primeira avaliação para todas as enzimas avaliadas - quando aplicado o glifosato, pode estar associada a presença de moléculas de carbono e fosfato em sua composição e a sua conhecida degradabilidade (Tabela 3.3). De acordo com Prata (2002) a inativação do glifosato no solo é controlada pela atividade microbiana do solo, aumentando, consequentemente o aumento da velocidade de degradação de sua molécula no solo.

A degradação de glifosato pode ocorrer por uma ampla diversidade de microrganismos do solo que utilizam estas moléculas como fonte de energia, bem como realizar a degradação do mesmo até produzir o ácido aminometil fosfônico e a sarcosina por meio de rotas catabólicas distintas, sendo a mineralização para dióxido de carbono o principal ponto final da degradação microbiana de glifosato (RUEPPEL et al., 1977; DICK; QUINN, 1995; ANZUAY et al., 2015).

Uma menor atividade foi observada para a arilsulfatase, nas três avaliações realizadas, no tratamento com oxifluorfem. O oxifluorfem ingrediente ativo presente em um herbicida seletivo de ação não sistêmica. A resposta desta enzima a aplicação do herbicida pode estar relacionada ao fato de que este pode estimular ou inibir a produção enzimática, bem como a morte de plantas invasoras do sistema solo pela ação do herbicida pode diminuir a atividade da arilsulfatase devido a morte de plantas daninhas no sistema.

Andaló et al. (2004) descrevem que a utilização de oxifluorfem em meio de cultura impede o crescimento vegetativo e a esporulação do fungo *Beauveria bassiana* no cultivo de café. A produção enzimática da arilsulfatase é realizada principalmente por fungos nos solos (LI; SARAH, 2003), o que pode explicar este resultado. Ainda, a presença ou a diminuição da diversidade vegetal e de microrganismos do solo influencia diretamente sua atividade no solo. A aplicação dos herbicidas (glifosato, oxifluorfem e clorimurófen etílico) após a terceira aplicação diminuiu a atividade enzimática da arilsulfatase.

Aos 10 dias após a primeira aplicação, a atividade da fosfatase ácida foi maior no tratamento controle (água) (Tabela 3.3). Aos 30 dias após a primeira aplicação, percebe-se que os valores médios para a fosfatase ácida foram maiores do que a avaliação após os 10 primeiros dias, no entanto os demais tratamentos ainda mostraram menor atividade enzimática quando comparado com a água. Isso indica que a atividade da fosfatase ácida foi reprimida inicialmente, provavelmente pela ação da molécula química adicionada aos solos. Somente após a terceira

aplicação, os defensivos estimularam a maior atividade da fosfatase ácida com glifosato, tiametoxam, tebuconazol e trifloxistrobinae imidacloprido e flutriafol. Yu et al. (2011) em seus resultados que a aplicação de glifosato no solo inicialmente diminuiu a atividade da fosfatase ácida, que pode estar relacionada a concentração de glifosato aplicada. Os autores afirmam ainda que após 7 dias de incubação dos solos houve aumento da atividade da fosfatase ácida.

A atividade enzimática da β -glucosidase foi influenciada pela adição de glifosato no solo, sendo este aos 10 dias após a primeira aplicação o único defensivo químico a diferir dos demais tratamentos. Aos 30 dias os herbicidas glifosato e clorimurrom etílico foram os maiores estimuladores da atividade da β -glucosidase, entretanto após a terceira não houve diferença entre os defensivos químicos utilizados (Tabela 3.3).

5.4.2 Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os defensivos químicos utilizados podem promover um efeito contínuo sobre os microrganismos do solo, possibilitando inferir que ocorre um contrabalanceamento na atividade metabólica, assim pode ocorrer diminuição do crescimento dos grupos mais sensíveis e/ou o aumento de microrganismos adaptados para a utilização dos recursos disponíveis a partir das moléculas químicas utilizadas.

Galli e Montezuma (2005) descrevem que no ambiente agrícola, o glifosato não causa impacto significativo sobre as populações microbianas em função da grande diversidade dos microrganismos, da composição físico-química dos solos e da dose efetiva para exercer alguma ação sobre eles. Os autores ainda descrevem que as populações de microrganismos podem adaptar-se à aplicação do produto, tornando-se pouco sensível à sua presença, sendo capaz de crescer satisfatoriamente, mesmo em concentrações elevadas. Apesar de não haver diferença significativa para o grupo bacteriano, deve-se tomar cuidado com o uso de defensivos químicos pois estes podem selecionar grupos microbianos nos solos, como exemplo a aplicação de glifosato pode induzir a resistência de bactérias ao glifosato, causando pressão seletiva na comunidade microbiana e promovendo alterações no crescimento destes microrganismos.

De qualquer maneira, espera-se, portanto, maiores alterações na estrutura das comunidades do que na abundância das mesmas. A partir destes dados observa-se que o glifosato não é diretamente tóxico, pois este pode diminuir a abundância de microrganismos sensíveis e aumentar a abundância de microrganismos mais adaptados para uso rápido de recursos disponíveis no solo (ZABALOY et al., 2012).

Os resultados indicam maior abundância de fungos do gene ITS codificador do gene 18S rRNA para os microcosmos tratados com glifosato, tiametoxam, tebuconazol e trifloxistrobinae imidacloprido e flutriafol. Resultado este semelhante ao obtido para a avaliação da atividade enzimática dos solos testados, no qual estes mesmos defensivos apresentaram maior atividade para essa enzima (Tabela 3.3). De acordo com Janaki et al., (2017) o aumento na abundância de microrganismos do solo, pode ser atribuído à capacidade destes em mineralizar temporariamente os defensivos químicos ali presentes, utilizando-os como fonte de energia, a comunidade microbiana seletiva possivelmente trabalhou na degradação destes defensivos químicos resultando em níveis elevados da atividade enzimática da fosfatase ácida e na abundância de fungos nos solos.

A aplicação de defensivos químicos no solo pode ocasionar em perturbações iniciais na comunidade microbiana, entretanto, com o tempo ela se reestabelece, graças a sua capacidade de resiliência e a não exposição total de microrganismos do solo à concentração do ingrediente ativo destes defensivos químicos (SIREESHA et al., 2012).

5.4.3 Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por Polimorfismo do Comprimento do fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP)

A estrutura da comunidade bacteriana mostrou comportamento distinto ao longo do tempo para a aplicação de glifosato nos solos, quando comparado aos demais tratamentos. O efeito do glifosato no solo foi estudado por diversos autores (HANEY et al., 2000; BUSSE et al., 2001; ARAÚJO et al., 2003; SCHLATTER et al., 2017) dentre estes, diferentes respostas com efeitos positivos e negativos foram encontradas em relação a estrutura da comunidade bacteriana dos solos. De acordo com Weaver et al. (2007) o efeito do glifosato, independentemente da dose, é de escala menor e transitória na comunidade microbiana do solo, além disto Zabaloy et al. (2012) descrevem que solos expostos ao glifosato causam apenas pequenas modificações na estrutura da comunidade microbiana de solos.

5.5 CONCLUSÃO

Cada enzima mostra um comportamento distinto para avaliação do efeito de defensivos aplicados via solo, ainda assim a atividade enzimática é um bom indicador bioquímico para a biodegradação de defensivos utilizados no café via solo.

A arilsulfatase foi mais influenciada pela aplicação dos defensivos ao longo do tempo.

A comunidade bacteriana apresentou diferença em sua estrutura após 10, 30 e 50 dias da primeira aplicação dos defensivos nos solos.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, E. N.; NÓBREGA, J. C. A.; FERREIRA, M. M. Métodos de controle de plantas daninhas no café afetam os atributos químicos do solo. **Ciência Rural**, v.39, p.749-757, 2009.
- ANDALO, V.; MOINO JR., A.; SANTA-CECILIA, L.V.C.; SOUZA, G.C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.463-467, 2004.
- ANZUAY, M. S.; FROLA, O.; ANGELINI, J. G.; LUDUEÑA, L. M.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A.; TAURIAN, T. Effect of pesticides application on peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated phosphate solubilizing soil bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 31-37, 2015.
- ARAUJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v.52, p.799–804, 2003.
- BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biol Biochem**, v. 33, p. 1777–2789, 2001.
- CARVALHO, V. L. DE; CUNHA, R. L. DA; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, v.7, p.42-49, 2012.
- CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; BIANCO, S. Sourgrass densities affecting the initial growth and macronutrient content of coffee plants. **Planta Daninha**, v. 31, p. 109-115, 2013.
- CASTRO, J. S. M. **Prática de Uso de Agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu, RJ: Um Estudo de Saúde Ambiental**. 1999, 159p. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1999.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, Safra 2018**. Brasília, DF, v.5, p.1-66, 2018.
- DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, p.545-550, 1995.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Revista Ciência Agrotécnica**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M. A.; CLEVELAND, C. C. Global patterns in belowground communities. **Ecology Letter**, v.12, p.1238-1249, 2009.
- GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Acadcom, 2005. 67p.
- HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. Effect of glyphosate on microbial activity and biomass. **Weed Sci**, v. 48, p. 89–93, 2000.

- JANAKI, P.; ARCHANA, M.; PRIYA, S. R.; NITHYA, C.; CHINNUSAMY, C.; PRABHAKARAN, N. K. Effect of herbicides on potato and their persistence in acid soil under semiarid tropical condition. **Advances in Plants Agriculture Research**, v. 7, 2017.
- LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 82, p. 6955–6959, 1985.
- LI, X., SARAH, P. Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a mediterranean-arid transect. **Applied Microbiology Biotechnology**, 35, 925, 2003.
- MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“Carryover”). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, p.151-164, 2011
- MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, 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**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- OLIVEIRA JR. R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, H. M. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. 1ed. Curitiba: Editora Omnipax, 2011. 362p.
- OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. **Comportamento de herbicidas no ambiente**. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Omnipax, 2011. p.263-304.
- NAVARRO-NOYA, Y.E.; GÓMEZ-ACATA, S.; MONTOYA-CIRIACO, N.; ROJAS-VALDEZ, A.; SUÁREZ ARRIAGA, M.C.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; JIMÉNEZ-BUENO, N.; VERHULST, N.; GOVAERTS, B.; DENDOOVEN, L. Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 65.p. 86-95, 2013.
- PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. Tese de doutorado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. 149 p.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton, CRC Press, 1994. 313p
- RUEPPEL, M.; BRIGHTWELL, B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, p. 517-528, 1977.
- SCHLATTER, D. C.; YIN, C.; HULBERT, S.; BURKE, I.; PAULITZ, T. Impacts of repeated glyphosate use on wheat-associated bacteria are small and depend on glyphosate use history. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, 2017.
- SCHÜTTE, U.M.E.; ABDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; SCHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.J. Bacterial succession in a glacier foreland of the high Arctic. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 3, p. 1258–1268, 2009.
- SIREESHA, A.; RAO, P. C.; RAMALAXMI, C. S.; SWAPNA, G. Effect of pendimethalin and oxyfluorfen on soil enzyme activity. **Journal of Crop and Weed**, v. 8, p. 124-128, 2012.
- TABATABAI, M. A. **Enzymes**. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A. & WOLLUM, A., eds. *Methods of soil analysis. Microbial and biochemical properties*. Madison, Soil Science Society of America, 1994. Part 2. p.775-833.
- ZABALOY, M. C.; GÓMEZ, E.; GARLAND, JAY, L.; GÓMEZ, M. A. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 333-339, 2012.

- YU, Y.; ZHANG, H.; ZHOU, Q. Using soil available p and activities of soil dehydrogenase and phosphatase as indicators for biodegradation of organophosphorus pesticide methamidophos and glyphosate. **Soil and Sediment Contamination**, v.20, p. 688–701, 2011.
- WEAVER, M.A.; KRUTZ, L.J.; ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. **Pest Management Science**, v. 63, p. 388-393, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de implantação de um novo cultivo de café arábica promove mudanças na atividade enzimática do solo, bem como na abundância da comunidade bacteriana e fúngica do mesmo. Adicionalmente, as diferentes classes de solos por possuírem distintas características de estrutura, aeração e agregação do solo, modulam a abundância de bactérias e fungos.

A diversidade vegetal presente no solo é um grande modulador da atividade enzimática do mesmo, sendo que sua qualidade e quantidade influenciam diretamente na disponibilidade de fontes energéticas para microrganismos do solo e consequentemente para a assimilação de moléculas inorgânicas pelos vegetais. No manejo das entrelinhas de café arábica com plantas de cobertura, a utilização da enzima β -glucosidase é mais indicada para ser utilizada como indicador de mudanças biológicas do solo, pois está mostrou maior sensibilidade as mudanças no manejo.

As práticas adotadas em campo no controle de pragas, doenças e plantas invasoras de café arábica, por meio da aplicação de defensivos químicos via solo, causam efeitos positivos e negativos sobre a comunidade microbiana do solo. A aplicação de herbicidas, fungicidas e inseticidas fornecem fontes de energia (S, P e C) nas primeiras aplicações via solo, causando aumento inicial na atividade enzimática do solo. Porém, a adição de moléculas químicas específicas no solo ao longo do tempo, pode influenciar a comunidade microbiana por meio de interações interespecíficas, dentre elas a competição, no qual as espécies podem migrar ou modificar seu nicho ecológico, passando a explorar outros recursos do ambiente.