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

**Estoque de carbono e nitrogênio e estrutura da comunidade de
diazotróficas em solos de caatinga com plantio de mamona**

Felipe José Cury Fracetto

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Felipe José Cury Fracetto
Biólogo

Estoque de carbono e nitrogênio e estrutura da comunidade de diazotróficas em solos de caatinga com plantio de mamona

Orientadora:
Prof^a. Dra. **BRIGITTE JOSEFINE FEIGL**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Fracetto, Felipe José Cury

Estoque de carbono e nitrogênio e estrutura da comunidade de diazotróficas em solos de caatinga com plantio de mamona / Felipe José Cury Fracetto. - - Piracicaba, 2009.
77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Biocombustíveis 2. Biomassa 3. Caatinga 4. Efeito estufa 5. Mamona 6. Microbiologia
Título

CDD 631.46
F797e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico e ofereço

Aos mesmos a quem dedico minha VIDA:

Aos membros da minha família, Jenice Rejane Cury Fracetto (mãe), Osmair José Fracetto (pai) e Josiane Rafaela Cury Fracetto (irmã), por todas as coisas cotidianas que fazem por mim, pelo carinho e amor eterno e por garantirem a minha sobrevivência.

À minha noiva Giselle Gomes Monteiro, pelo amor e companheirismo intenso, por toda a orientação, compreensão e pelo conhecimento que obtive durante a realização prática e teórica de toda a Biologia Molecular contida neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Brigitte Josefine Feigl e ao coordenador do projeto Carlos Clemente Cerri, por todo apoio, paciência e dedicação durante estes 2 anos de trabalho.

A amiga e companheira de trabalho, Leidivan Frazão, por contribuir e orientar nas coletas e no preparo de solos realizados na Bahia durante todas as viagens.

A minha equipe amiga do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Lilian Campos, Sandra Nicoletti, Dagmar Marquesoni e Marcos Siqueira Neto, sem a qual não haveria suporte prático na demanda das amostragens deste trabalho e de muitos outros.

Ao amigo Professor Roberto Telles, pelos conselhos humanos, didáticos amizade sincera e generosidade.

Aos proprietários da fazenda de mamona, Sr. Jairo Dourado e o filho Vital Dourado, por garantir acesso ao experimento.

Ao pessoal da cooperativa de Irecê-BA, Orlando e Genildo, responsáveis pela indicação da fazenda de mamona.

Ao amigo Dílson (funcionário da Opalma-Taperoá-BA) pela organização e suporte técnico durante as coletas de solo e ao amigo Guanais (funcionário da PETROBRAS) pela logística e recomendações.

A todo o povo da Bahia pela recepção calorosa e inigualável que esbanja alegria e humanitarismo.

A PETROBRAS pelo vínculo e manutenção deste trabalho.

Ao amigo e orientador Carlos Eduardo Cerri (Ado) pelo apoio e confiança no decorrer dos artigos publicados e por toda amizade.

À coordenação do departamento de Microbiologia Agrícola pelo apoio geral.

Aos amigos verdadeiros, com os quais eu convivo e mantenho contato atual, sem a necessidade de citar nomes em função do auto-reconhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão bibliográfica	15
2.1.1 História da mamona	15
2.1.2 A mamona como matéria-prima na produção de biocombustível.....	16
2.1.3 Produção de mamona no estado da bahia.....	16
2.1.4 Torta de mamona como adubo orgânico.....	17
2.1.5 Estoque de C e N e a comunidade de microrganismos no solo.....	18
2.1.6 Fixação biológica de nitrogênio e microrganismos diazotróficos.....	18
2.1.7 Nitrogenase.....	19
2.1.8 Estudo da diversidade de diazotróficos.....	21
3 Material e métodos.....	23
3.1 Coletas das amostras de terra	23
3.2 Quantificações dos estoques de carbono e nitrogênio do solo	26
3.3 C e N do solo pela parte aérea do vegetal	27
3.4 Metodologia para a emissão de gases do efeito estufa	28
3.5 Avaliação físico-química do solo da fazenda floresta-Irecê-BA.....	29
3.6 Análises microbiológicas do solo.....	30
3.7 Análise da estrutura das comunidades de diazotróficos	30
3.8 Extração do dna total do solo	31
3.9 PCR.....	31
3.10 DGGE.....	32

3.11 Análise dos dados	32
3.12 Avaliação da atividade da nitrogenase	33
3.13 Biomassa microbiana do solo	34
4 Resultados e discussão	37
4.1 Textura do solo	37
4.2 Estoques de carbono no solo	38
4.3 Estoques de nitrogênio no solo	41
4.4 Relação C:N	44
4.5 Massa seca, teores e estoques de C e N dos resíduos culturais	44
4.6 Fluxos de gases do efeito estufa (GEE)	47
4.7 Biomassa microbiana no solo	51
4.7.1 Carbono da biomassa microbiana do solo	51
4.7.2 Nitrogênio da biomassa microbiana do solo	53
4.7.3 Relação C:N da biomassa microbiana no solo	55
4.8 Avaliação da atividade da nitrogenase	56
4.9 Estrutura da comunidade de diazotróficas	57
4.9.1 Análise do DGGE	57
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Entre as principais oleaginosas eleitas para a produção de biodiesel, encontra-se a mamona (*Ricinus communis* L.), por possuir elevado teor de óleo, conhecido como óleo de rícino, extraído pela prensagem das sementes, contendo 90% de ácido graxo ricinoléico, o qual confere ao óleo suas características singulares, possibilitando ampla gama de utilização industrial. A produção brasileira de mamona concentra-se na caatinga baiana. A agricultura desta região, embora seja feita sem o uso de insumos agrícolas mantém uma produtividade regular. Com isso, tornou-se importante avaliar o “efeito ambiental” desta cultura sobre os estoques de C (carbono) e N (nitrogênio) no solo e os mecanismos de sua manutenção. Este trabalho foi realizado em solos de uma fazenda na região de Irecê-BA, tendo como objetivos calcular os estoques de C e N no solo; calcular o fluxo de gases do efeito estufa dos resíduos de mamona; calcular os valores C e N da biomassa microbiana no solo (BMS) e analisar o perfil da comunidade de bactérias fixadoras de N_2 no solo por PCR-DGGE. Os resultados indicaram a ausência de variações nos estoques de C entre os tratamentos de mamona com 10, 20 e 50 anos de cultivo (48 Mg ha^{-1}) sendo superados pelos valores encontrados na caatinga (90 Mg ha^{-1}); mesma condição para o estoque de N ($5,3 \text{ Mg ha}^{-1}$ nos tratamentos de mamona e 8 Mg ha^{-1} na caatinga). Já os valores de C-microbiano foram superiores na caatinga, mas não apresentaram diferenças entre os cultivos de mamona; para o N-microbiano, os valores não sofreram diferenças entre as camadas, porém foram inferiores no tratamento de mamona com 10 e 50 anos de cultivo. O fluxo de gases de $N-N_2O$ e $C-CO_2$ foram maiores para o tratamento com aplicação de resíduos orgânicos de mamona chegando a $160 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ de $C-CO_2$ e $600 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ de $N-N_2O$. O teste de redução de acetileno (ARA) e a análise de DGGE indicaram que o perfil da comunidade de bactérias diazotróficas do solo nos diferentes tratamentos sofreu alteração e permitiu a estocagem de N no solo durante os 50 anos de cultivo viabilizando, ambientalmente, a produção de mamona nesta região.

Palavras-chave: Mamona; Biocombustível; Biomassa, Caatinga, Efeito estufa; DGGE

ABSTRACT

Among the main oils elected for biodiesel production is the castor bean (*Ricinus communis* L.) for its high oil content, known as castor oil extracted by pressing the seeds containing 90% ricinoleic acid, which gives the oil its unique features, allowing a wide range of industrial use. Brazilian production of castor oil is concentrated in the tropical dry forest of Bahia. Farming in this region, although it is made without the use of agricultural inputs remains a regular productivity. With this, it became important to assess the "environmental effect" of this culture on the stocks of C (carbon) and N (nitrogen) in soil and the mechanisms for its maintenance. This work was carried out in soils of a farm in Irecê-BA, aimed to calculate the stocks of C and N in soil, calculated the flows of greenhouse gases from oil waste; to figure out the values of carbon (C) and nitrogen (N) of microbial biomass in soil (BMS) and to analyze the profile of the community of N₂-fixing bacteria in soil through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Results indicated the absence of changes in C stocks between treatments of castor oil with 10, 20 and 50 years of cultivation (about 48 Mg ha⁻¹) being outweighed by values found in the tropical dry forest (90 Mg ha⁻¹); same condition verified for the stock of N (5.3 Mg ha⁻¹ treatments of castor and 8 Mg ha⁻¹ in tropical dry forest). As for values of microbial-C, they were higher in the tropical dry forest and did not present differences between the cultures of castor oil; regarding microbial-N values, there have not been differences between the layers, but they were lower for castor oil with 10 and 50 years of cultivation. The gases flow accumulated N-N₂O was significantly higher than that of C-CO₂ and higher for the treatment of soil with organic fertilizer castor reaching 160 mg m⁻² h⁻¹ of C-CO₂ and 600 mg m⁻² h⁻¹ of N-N₂O. ARA analysis and DGGE indicated that the profile of the diazotrophic community of soil in different treatments had change, allowing the storage of N in soil during the 50 years of cultivation enabling, in environmental terms, the production of castor oil in this region.

Keywords: Castor bean; Biofuel; Biomass; Tropical dry forest; Greenhouse; DGGE

1 INTRODUÇÃO

Os relatórios técnicos do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC, 2006) têm demonstrado que a queima de combustíveis fósseis é responsável por mais de dois terços das emissões antrópicas de GEE (gases do efeito estufa) causadores do aquecimento global.

O Brasil já tem posição de destaque no cenário internacional de biocombustíveis devido ao seu potencial de produção e também ao sucesso alcançado com o PROÁLCOOL, implantado na década de 70 e que entre acertos e erros, atingiu e superou suas metas. Segundo a *National Biodiesel Board*, dos Estados Unidos, o Brasil tem condições de produzir 60% da demanda mundial de óleo diesel mineral.

O biodiesel pode representar uma ótima inovação sustentável para a sociedade brasileira, gerando efeitos positivos em vários segmentos (social, econômico, meio ambiente, etc.), tendo em vista a crescente preocupação não só dos ambientalistas, mas também das autoridades em criar estratégias para o desenvolvimento do país. Estudos indicam que comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em até 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas no processo fotossintético. Além disso, pode reduzir em até 90% as emissões de fumaça e praticamente eliminar as emissões de óxido de enxofre.

Com a necessidade de garantir a continuidade da vida no planeta, toda a comunidade política e econômica busca acordos para a necessidade de diminuir os problemas climáticos e a escassez de recursos naturais, através de investimentos em pesquisas de tecnologias renováveis e novas formas de consumo e interação com o meio ambiente.

Atualmente, no entanto, o uso de biocombustível é imprescindível como alternativa de substituição do combustível fóssil (maior fonte global de GEE). Tornou-se necessário avaliar todas as emissões da cadeia produtiva para propor alterações nos processos de redução da emissão de gases e tornar o produto atrativo no aspecto ambiental, econômico e social dentro do agronegócio internacional.

Essa tendência implica profundas mudanças na política ambiental, comercial e econômica dos países em desenvolvimento que pretendem participar desse mercado emergente e de alta rentabilidade. Tendo em vista o rápido desenvolvimento da

produção de biocombustíveis, é vital a compreensão e a quantificação também dos seus efeitos sobre o ambiente e de proteção ao clima. É necessário provar que a bioenergia representa uma fonte energética realmente “limpa”.

Para atingir esse objetivo é necessário monitorar todas as fases da produção deste biocombustível, desde o cultivo da matéria prima oleaginosa até a disposição dos resíduos produzidos durante o processo industrial. O resultado final deve refletir o “*carbon footprint*” (ROSS, 2006) da produção em termos de emissão de gases do efeito estufa (GEE), expresso em “equivalente de carbono” ou Ceq (WIEDMANN; MINX, 2007). O biocombustível será tanto mais atrativo no “*offset*” de um combustível fóssil, quanto menor a emissão de GEE associados à sua produção.

Algumas oleaginosas utilizadas para extração de óleo vegetal são: baba de mamona, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, grão de amendoim, semente de canola, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate e de nabo forrageiro.

Para este estudo, foi utilizada a mamona como matéria-prima fornecedora de biodiesel e, mantendo o parâmetro da sustentabilidade como base, coube um estudo específico, avaliando as condições do solo com cultivo de mamona, observando os fatores químicos e biológicos decorrentes do cultivo desta oleaginosa, tendo como principais objetivos:

- Calcular os estoques de carbono (C) e nitrogênio (N) do solo em função do tempo de cultivo da mamona;
- Calcular as emissões de CO₂, N₂O e CH₄, em função da atividade microbiana decorrente do produto torta (farelo) de mamona utilizada como adubo orgânico natural;
- Calcular o C e N da biomassa microbiana do solo (BMS) no cultivo de mamona.
- Avaliar o perfil da comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) no solo com plantio de mamona, por meio de um estudo envolvendo técnicas da biologia molecular.

2 Desenvolvimento

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 História da mamona

A mamona, cientificamente denominada *Ricinus communis* L., é uma planta oleaginosa da família Euphorbiaceae. No Brasil, conhece-se a mamona sob as denominações de mamoneira, rícino, carrapateira, bafureira, baga e palma-criste; na Inglaterra e Estados Unidos, pelo nome de "*castor bean*" e "*castor seed*".

A mamoneira é uma xerófila e heliófila, provavelmente originária da Ásia, explorada comercialmente entre as latitudes 40°N e 40°S. No Brasil, sua introdução deu-se durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos.

A origem desta planta é muito discutida, já que existem relatos, em épocas bastante longínquas de cultivo na Ásia e na África. O grande número de variedades encontradas tanto no continente africano, como no asiático, impossibilita qualquer tentativa de estabelecer uma procedência efetiva da mamona.

Alguns pesquisadores acreditam que a mamona tenha sido originária da África, mais precisamente da Etiópia; essa região situa-se entre os paralelos 5° e 15°S.

A facilidade de propagação e de adaptação em diferentes condições climáticas propiciou a mamona ser encontrada ou cultivada nas mais variadas regiões do mundo, como no norte dos Estados Unidos até a Escócia. O clima tropical, predominante no Brasil, facilitou o seu alastramento. Assim, hoje podemos encontrar a mamoneira em quase toda extensão territorial, como se fosse uma planta nativa e em cultivos destinados à produção de óleo.

De qualquer forma, menção dela é feita desde a mais remota antigüidade, pois segundo autores clássicos já era conhecida à época dos antigos egípcios que a apreciavam como planta milagrosa, sendo igualmente utilizada na Índia desde os tempos imemoriais para os mais diversos fins. No Brasil a mamona foi trazida pelos portugueses sendo conhecida desde a era colonial quando dela se extraía o óleo com a finalidade de utilizar para iluminação e lubrificação dos eixos das carroças, além de engrenagens e os mancais dos inúmeros engenhos de cana.

2.1.2 A mamona como matéria-prima na produção de biocombustível

O óleo é o mais importante constituinte da semente de mamona, conhecido como óleo de rícino, extraído pela prensagem das sementes e contém 90% de ácido graxo ricinoléico, o qual confere ao óleo suas características singulares, possibilitando ampla gama de utilização industrial (EMBRAPA, 2007).

A mamona apresenta uma das culturas eleitas pelos programas federais e estaduais de biodiesel para fornecer matéria-prima para a produção do biodiesel sendo um biocombustível apontado com o renovável e menos poluente que o seu concorrente fóssil, o diesel (AGÊNCIA NACIONAL DO PETROLEO-ANP, 2007).

Contudo, um estudo feito pela ANP, (2008) mostrou que o biodiesel puro de mamona não atendia às especificações governamentais exigidas, por seu óleo possuir elevada viscosidade e, portanto a energia do óleo da mamona seria inadequada para motores movidos a diesel, necessitando misturar a outros compostos para atender às necessidades mecânicas. A viscosidade do óleo da mamona como matéria-prima varia entre 20 a 30 mm s⁻¹ (milímetros por segundo), portanto, acima dos limites permitidos na resolução da ANP, entre 3 e 6 mm s⁻¹. Quanto maior a densidade do óleo vegetal menor a velocidade em que o fluído se movimenta no interior do motor (ANP, 2009).

2.1.3 Produção de mamona no estado da Bahia

Com relação à produção total de biodiesel no estado da Bahia de janeiro a agosto de 2008 o somatório foi de aproximadamente 57.000 m³ comparado a produção total de 71.800 m³ no ano de 2007. (ANP, 2008).

No ano passado a produção foi de 124,2 mil toneladas e a previsão para 2009 é de 90,2 mil toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2009).

A produção anual em toneladas de mamona produzida esperada até agosto de 2009 é de 200.000, com um rendimento médio de 1100 kg ha⁻¹ e o preço da mamona hoje está exigido para R\$ 0, 6432 o quilo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2009).

Atualmente é produzido cerca de 700 quilos da matéria-prima por hectare plantado, mas o potencial de produtividade é 20 vezes maior, podendo chegar até 15 mil quilos por hectare (IBGE, 2009).

2.1.4 Torta de mamona como adubo orgânico

A adição de torta de mamona no solo, com dosagens variando de acordo com a cultura e o tipo de solo e da riqueza de nutrientes, além de suprir as necessidades nutricionais das plantas, promove a elevação do pH, reduzindo a acidez total, eleva o conteúdo de carbono o que acaba por proporcionar um maior poder tampão e o aumento na capacidade de troca de cátions do solo (PRIMAVESI, 1980). Também foram encontradas melhorias gerais nas condições físicas do solo, como a redução da densidade aparente do ambiente edáfico em todos os tipos de solos (KIEHL, 1979), o que interfere positivamente no crescimento e no desenvolvimento radicular, devido à melhor porosidade do solo, com mais rápida renovação do oxigênio, além de reduzir os nematóides (LEAR, 1959).

A torta de mamona como condicionante do solo e melhoradora da estrutura do mesmo, ou seja, da bioestrutura, é melhor do que as demais tortas, devido a riqueza em fibra (ASSIS et al., 1962), pois é este material que ao ser processado por bactérias aeróbicas como *Cytophaga* e *Sporocytophaga* que produzem a cola bacteriana, elemento fundamental para a formação dos grumos e a conseqüente estabilidade dos agregados nos solos tropicais.

Para cada tonelada de semente de mamona processada, são gerados 620 kg de casca (SEVERINO et al., 2005) e 530 kg de torta de mamona (SEVERINO, 2005). Como a produção brasileira de mamona foi de 270 mil toneladas em 2007, estima-se que tenham sido produzidas aproximadamente 130 mil t de cascas e 111 mil t de torta. Tradicionalmente, estes dois produtos têm sido utilizados como adubo orgânico, sendo a torta comercializada por conter alto teor de nitrogênio e as cascas apenas levadas de volta para dentro da lavoura, aproveitada na própria fazenda ou aplicadas em culturas de feijão.

2.1.5 Estoque de C e N e a comunidade de microrganismos no solo

Os estoques de C e N contidos nos solos sob vegetação nativa sofrem modificações quando esses sistemas são convertidos ao uso agrícola. Dependendo do sistema de manejo do solo empregado os estoques podem permanecer iguais, aumentar ou diminuir em relação ao sistema natural.

O solo é um sistema biológico dinâmico e complexo, no qual diferentes organismos desempenham papéis fundamentais para a manutenção e a sobrevivência de comunidades vegetais e animais nos ecossistemas terrestres. Tais papéis são desempenhados por funções que incluem: a mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e energia (O'DONNELL et al. 2000), fixação do nitrogênio atmosférico (MELO; AZEVEDO, 1998), decomposição de xenobióticos (MELO; AZEVEDO, 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), e produção de compostos complexos responsáveis pela agregação de partículas do solo com melhoria de sua estrutura (DODD et al., 2000), além do controle biológico de pragas e doenças.

A diversidade microbiana caracteriza-se pelo número de diferentes espécies de fungos e bactérias e sua relativa abundância na microflora do solo (ALTIERI, 1999). A diversidade funcional da microbiota do solo é determinada pela diversidade genética, e esta pode ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (LAMBAIS et al., 2005), permitindo o entendimento da complexidade da ligação entre diversidade microbiana e suas funções no solo e a compreensão das relações entre diversidade genética e a estrutura de comunidades (NANNIPIERI et al., 2003).

Portanto, é de extrema importância o conhecimento de uma estrutura de comunidade de microrganismos, pois conhecendo seus mecanismos de desenvolvimento torna-se possível estabelecer atributos físico-químicos ao solo em questão.

2.1.6 Fixação biológica de nitrogênio e microrganismos diazotróficos

O nitrogênio é um elemento químico presente abundantemente na atmosfera na forma de N_2 , porém, a maioria dos seres vivos não consegue incorporá-lo nesta forma a esqueletos de carbono. Apenas uma pequena parcela de procariotos é capaz de reduzir

o N_2 para a forma combinada NH_3 , que pode então tornar-se disponível para plantas e outros organismos. Estes microrganismos são bactérias, conhecidos como fixadores de N_2 ou diazotróficos e o processo é denominado como fixação biológica do nitrogênio (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; TEIXEIRA, 2005). O N_2 atmosférico também pode ser fixado naturalmente mediante descargas elétricas na atmosfera, e de forma artificial por meio de processos industriais utilizados para a produção de fertilizantes. No entanto, o processo biológico contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no planeta, cerca de 65% do total (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maioria das espécies de bactérias fixadoras de N_2 é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, em águas doces e salgadas e no trato intestinal de certos animais. Alguns fixadores são encontrados em simbiose com várias espécies vegetais, enquanto outros estabelecem relações menos especializadas com plantas, sendo denominados de associativos. Algumas bactérias diazotróficas podem, além de colonizar abundantemente a rizosfera, ocorrer endofiticamente, ou seja, invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Baldani et al. (1997) propuseram a distinção em endófito facultativo e obrigatório para diferenciar, respectivamente, bactérias capazes de sobreviver no solo e estabelecer-se nas raízes daquelas com baixa capacidade de sobreviver no solo e capazes de colonizar raízes e parte aérea.

Portanto, é de extrema importância conhecer a ciclagem de nutrientes, isolar e identificar os microrganismos responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio, incentivar o aumento no número de pesquisas relacionadas a este tema e compartilhar resultados com demais departamentos.

2.1.7 Nitrogenase

A enzima que catalisa o processo de redução do N_2 atmosférico a NH_3 é denominada nitrogenase. Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase: nitrogenase-1, que possui molibdênio (Mo) e ferro (Fe); nitrogenase-2, em que o vanádio (V) substitui o Mo; e nitrogenase-3, que só tem Fe (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; TEIXEIRA, 2005).

A nitrogenase é uma enzima extremamente versátil, pois, além do N_2 , catalisa a redução de vários outros substratos, entre eles o acetileno (C_2H_2). A atividade de redução do acetileno para etileno (C_2H_4) tem particular importância nos estudos de sistemas fixadores de N_2 . A técnica, que utiliza cromatografia gasosa para medir o etileno, é bastante sensível, relativamente rápida, de baixo custo e fácil condução, podendo ser utilizada em estudos qualitativos para detectar a presença da enzima e, conseqüentemente, de um organismo fixador (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BURRIS, 1972).

A fisiologia dos microrganismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da nitrogenase que são: alta sensibilidade ao oxigênio; necessidade dos metais Fe, Mo ou V, seus componentes estruturais; suprimento adequado de poder redutor; MgATP para sua atividade; e ambiente em que o N combinado não esteja disponível (REIS; TEIXEIRA, 2005).

Para conciliar o processo de fixação de N_2 , estritamente anaeróbio, e seu metabolismo, os diazotróficos aeróbios desenvolveram vários mecanismos para proteger o sítio de ação da nitrogenase da interferência do O_2 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entretanto, algumas espécies de diazotróficos aeróbios, como *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., não apresentam mecanismos de proteção contra o O_2 e por isso são microaerofílicos quando fixam N_2 . Em meios de cultivo sem adição de N, com consistência semi-sólida, estas bactérias ocupam sítios onde a concentração de O_2 é baixa, sendo suficiente para sua respiração, sem excessos que possam afetar a nitrogenase. Nessa faixa, formam-se películas que movem-se em direção à superfície, conforme as células se multiplicam atingindo número suficientemente elevado para escoar o O_2 excessivo que se acumula em volta das mesmas, ativando assim a nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esta descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica do nitrogênio nas associações entre diazotróficos e plantas não leguminosas (BALDANI et al. 1997).

2.1.8 Estudo da diversidade de diazotróficos

A fixação biológica de N_2 é mediada por uma parcela de procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O conceito de diversidade de espécies está relacionado com a identidade e distribuição das mesmas em uma dada região ou hábitat (COLEMAN; WHITMAN, 2003).

O estudo de diversidade de procariotos é extremamente complexo, visto que a definição de espécie para estes organismos é uma questão ainda em aberto. À medida que novas tecnologias vão surgindo, os estudos vão progredindo, abrangendo novidades e, conseqüentemente, as teorias vão se modificando e aperfeiçoando (GEVERS et al. 2005).

Atualmente, uma espécie procariótica é considerada como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe-padrão, que é caracterizado por certo grau de consistência fenotípica, apresentando 70% ou mais de homologia DNA-DNA e mais de 95% de similaridade entre seqüências do gene 16S rRNA. Neste contexto, destaca-se a importância da taxonomia polifásica, que tem como objetivo integrar diferentes tipos de dados e informações fenotípicas, genéticas e filogenéticas sobre os microrganismos e essencialmente indicar uma taxonomia de consenso (GEVERS et al. 2005).

Com o avanço da Biologia Molecular, tornou-se possível identificar bactérias no solo e em plantas sem a necessidade de isolá-las. Para isso, após a extração do DNA total, são empregados iniciadores para amplificação específica dos genes 16S rRNA (genes *nifH*) bacterianos por PCR (WEISBURG, 1991) e o DNA amplificado, passa pela técnica do DGGE obtendo então informações a respeito da estrutura da comunidade diazotrófica envolvida e que posteriormente, poderão ser seqüenciadas.

3 Material e Métodos

As etapas metodológicas da coleta das amostras de solo e folhas foram realizadas no estado da Bahia em maio de 2008 e fevereiro de 2009, no município de Irecê, localizado no centro-norte baiano a 11° 18' 14" S e 41° 51' 21" O, com área total de 17.379,725 km².

A economia do município e região é baseada na produção agrícola de policultura, dando-se destaque além da produção de mamona e feijão, à produção de cebola, tomate, beterraba, cenoura, pinha (que também tem grande destaque na região). Baseia-se também a economia na pecuária e no comércio local, que começa a se desvincular da produção agrícola, tornando-se logo auto-suficiente. O município é considerado um dos primeiros produtores de feijão do nordeste, e o segundo do País.

No estado da Bahia as culturas de mamona utilizadas no plantio são: BR-Nordestina e BR-Paraguaçu. Estas espécies são mais resistentes a pragas e doenças e produzem maior quantidade de óleo. Geralmente, a mamona é cultivada em consórcio com a cultura do feijão ou de milho e após 1 ano ocorre a poda manual dos cachos de mamona e no mês seguinte ocorre a sua rebrota, no intuito de aumentar a produtividade. Os espaçamentos para cultivo da mamona são: 2 metros entre plantas e 4,5-6,0 m entre linhas.

Após as colheitas dos cachos, as etapas de extração do óleo são administradas pelas cooperativas locais.

Na cooperativa a produção de óleo e do produto torta de mamona, é originada da moagem das cascas e dos frutos. Estes são utilizados como adubo orgânico e são revendidos para outros produtores aplicarem em culturas como do café, soja, milho, etc.

3.1 Coletas das amostras de terra

Na Fazenda Floresta, local domiciliar escolhido para este estudo, a cultura da mamona é conduzida sob sistema de produção familiar, com preparo do solo e sem uso de adubação ou outros insumos agrícolas. As primeiras áreas de caatinga foram abertas em 1960 para plantio de milho e mamona. As áreas selecionadas para este estudo foram:

- I. Caatinga: área sob vegetação nativa que foi escolhida como ponto de referência para a região (Figura 1);
- II. Área IR60 ou mamona-50 anos: aberta em 1960, sempre utilizando consórcio com as culturas de milho e mamona (Figura 2);
- III. Área IR80 ou mamona 20 anos: implantada em 1988, ausente de consórcios. (Figura 3);
- IV. Área IR90 ou mamona 10 anos: implantada em 1998, ausente de consórcios. (Figura 4).

Figura 1- Área de caatinga localizada em Irecê (BA)

Figura 2- Área implantada em 1960 em Irecê (BA)

Figura 3- Área implantada em 1988 em Irecê (BA)

Figura 4- Área implantada em 1998 em Irecê (BA)

3.2 Quantificações dos estoques de carbono e nitrogênio do solo

As coletas foram realizadas em solos de mamona com idades de 10, 20 e 50 anos de cultivo, além de uma testemunha que se refere à caatinga (floresta da região).

As amostragens do solo foram feitas em cinco trincheiras, sendo uma trincheira de um metro de profundidade no meio, cercada de quatro outras com 30 centímetros. Em todas as trincheiras e profundidades foram coletadas amostras indeformadas pelo método do anel volumétrico (5 x 5cm) para determinação da densidade do solo. As disposições das trincheiras estão destacadas na Figura 5.

Figura 5- Método de coleta de solos para análises de C e N total.

Ao realizar as coletas das amostras de solo, estas foram devidamente etiquetadas e levadas ao laboratório de Biogeoquímica Ambiental-CENA/USP, em Piracicaba-SP.

As amostras de terra foram secas ao ar, destorroadas manualmente e peneiradas a 2 mm para posterior análise. Estas foram moídas e passadas em peneiras de 100 mesh.

Os estoques de carbono de cada camada (Mg ha^{-1}) foram determinados pela associação da concentração de carbono (%) à respectiva densidade (g cm^{-3}). O teor de carbono total das amostras foi determinado por espectroscopia no infravermelho próximo em equipamento Antaris MDS FT-NIR. Após as análises, utilizando-se o equipamento Antaris, um subconjunto de amostras definido pelo programa para o processo de calibração foi também determinado por combustão a seco em equipamento LECO CN-2000.

Assim, os estoques de C e N foram calculados a partir dos teores de C ou N com a densidade do solo para cada camada amostrada (Equação 1) (NEILL et al., 1997; BERNOUX et al., 1998).

$$E = d \times h \times (C \text{ ou } N) \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

E = estoque de carbono ou nitrogênio total do solo (Mg ha^{-1});

d = densidade aparente do solo;

h = espessura da camada amostrada;

C ou N = teor de carbono ou nitrogênio total do solo

3.3 C e N do solo pela parte aérea do vegetal

A parte aérea das plantas de mamona que se deposita no solo refere-se apenas as suas folhas, uma vez que os cachos ou demais resíduos não são depositados no solo, sendo feita a sua retirada mensalmente pelos produtores da fazenda escolhida para o estudo das amostragens.

Portanto, para calcular a entrada de C e N pela parte aérea, foi realizado um experimento no tratamento com 50 anos. Nesta área foram instalados sombrites sobre

o solo (5 repetições) (Figura 6), entre os pés de mamona num espaço de aproximadamente 3 m², no intuito de realizar a coleta e obter a pesagem total das folhas de mamona mensalmente de março a maio de 2009 que corresponde ao período máximo de maturação da mamona, podendo haver quedas em suas folhagens.

As folhas de mamona foram trazidas para o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, lavadas em água deionizada, secas na estufa a 60°C por 72 horas com circulação de ar e moídas no moinho MA-340. Após este preparo, as amostras moídas tiveram seu seus teores de C e N determinados pelo LECO CN-2000.

Assim, pode-se obter o valor dos estoques de C e N destes resíduos culturais multiplicando o valor dos estoques de C ou N pelo valor das respectivas massas secas obtidas.

3.4 Metodologia para a emissão de gases do efeito estufa

Para a avaliação da emissão dos gases CO₂ e N₂O em função da atividade respiratória microbiana na torta (farelo) de mamona, foi instalado um experimento, em condições ambientais controladas (incubação em laboratório). O produto foi coletado na empresa A. Azevedo Indústrias e Comércio de Óleos LTDA, situada na cidade de São Paulo, que comporta as mesmas espécies de mamona utilizadas na Região de Irecê-BA, que consiste no cultivar BRS Nordestina e BRS Paraguaçu. As incubações foram realizadas utilizando 3 tratamentos, sendo 50 g do mesmo solo coletado em Irecê-BA (solo), servindo como testemunha, 0,2 gramas de farelo de mamona misturados a este solo (solo com farelo), que irá simular a aplicação do farelo ao solo e apenas 0,2 g de farelo de mamona (farelo) para obter a diferença entre solos com farelo e apenas farelo. Todos esses tratamentos foram condicionados em recipiente de vidro (800 mL), hermeticamente fechado com tampa e com um béquer com 20 mL de água para manter a umidade durante o período de incubação.

Os frascos foram abertos quando a concentração de CO₂ atingiu 40.000 ppm, pois até esse valor pode-se garantir que a respiração heterotrófica da microbiota do solo não seja inibida (PAUL, CLARCK, 1989). A temperatura de incubação foi de 25°C,

e a umidade do solo de 60% da capacidade de campo (cc), com 5 repetições para cada tratamento.

Após 48 horas de incubação em estufa regulada a 25°C as amostras foram retiradas e com seringas BD de 20 mL retirou-se o gás do interior dos frascos e em seguida analisaram-se os gases CO₂ e N₂O no cromatógrafo Shimadzu SRI-8610.

Foram realizadas 5 análises das quais as 3 primeiras ficaram incubadas por 48 horas e as 2 últimas incubadas por 120 horas. Após as análises os resultados foram tabulados em cima da média do somatório total dos gases dos 5 dias de análises, incluindo o desvio padrão.

3.5 Avaliação físico-química do solo da Fazenda Floresta-Irecê-BA

Após terem sido peneiradas a 2 mm, as amostras de solo das áreas cultivadas com mamona foram caracterizadas físico-quimicamente para avaliar a densidade, o pH, e textura do solo em função da quantidade de silte, areia e argila.

Análise de pH em H₂O e KCl (1 mol L⁻¹), seguindo a metodologia proposta por Anderson e Ingram (1989).

A densidade do solo foi realizada em laboratório nas camadas de 0 até 30 cm com auxílio de um cilindro de aço inox (5x5 cm) e, após obter a massa e retirado uma alíquota de 5 gramas para umidade gravimétrica, obteve-se a densidade aparente do solo segundo (BLAKE; HARTGE, 1986). Tendo o peso seco das amostras e o volume do cilindro conhecido (99,4 cm⁻³), usando a relação massa por volume, calculou-se o valor da densidade aparente do solo.

A capacidade de campo das amostras de solo foi determinada após a adição de 30 gramas de solo (TFSA, tamisadas em peneira de 2 mm) em um funil de plástico com 10 cm de diâmetro, vedado com lã de vidro para evitar perda do material. Posteriormente as amostras de solo foram saturadas com água deionizada e os funis foram cobertos com filme plástico para minimizar perdas de água por evaporação e assim permaneceram por 6 horas para drenagem do excesso de água. Em seguida cerca de 5 gramas de solo foram secas em estufa de 105° C até obter massa constante. A capacidade de campo foi determinada utilizando a equação 2.

$$C.C = P1 - P2 / P2$$

$$\text{Eq. 2}$$

Onde C.C= capacidade de campo, P1= peso da amostra de solo úmida (g), P2= peso da amostra de solo seca (g).

Para determinar a textura do solo nos diferentes tratamentos de mamona, pelo método do ultra-som (GEE; BAUDER, 1986) utilizou-se uma peneira de malha fina de 53 μm (SIX, 1996), podendo-se separar as frações de silte, argila e areia.

3.6 Análises microbiológicas do solo

Para as demais análises microbiológicas foi realizada a coleta de solos nos seguintes tratamentos:

A- Mamona consorciada com milho- Refere-se ao mesmo tratamento de mamona (50 anos) da primeira coleta.

B- Mamona pura ou sem consórcio– Refere-se ao tratamento de mamona 10 anos da primeira coleta.

C- Caatinga – Servirá como referência (testemunha), sendo a mesma da primeira coleta.

3.7 Análise da estrutura das comunidades de diazotróficos

Tendo em vista as análises microbiológicas do solo, foram coletadas as terras desses 3 tratamentos, com profundidade de 20 cm, utilizando gradagem. As amostras de terra foram coletadas próximas aos pés de mamona no tratamento de mamona-50 anos, mamona-10 anos e nos solos da caatinga. Em todos os tratamentos foram coletadas 5 repetições entre 5 linhas, gerando 5 repetições que, por conseguinte, geraram uma amostra composta entre cada linha. Nos solos da caatinga os 5 pontos foram aleatórios sem amostra composta. No total, foram obtidas 15 amostras de solo. Após a coleta, os solos foram lacrados em sacos de plásticos, identificados e posteriormente congelados em freezer a -10°C no Laboratório de Microbiologia do Solo - Departamento de Ciências do Solo - ESALQ/USP.

3.8 Extração do DNA total do solo

Para a extração do DNA do solo utilizou-se o *Kit UltraClean Soil DNA Isolation* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA). Brevemente, foram utilizados 0,25 g de solo adicionado em microtubos contendo granada finamente moída e as células foram lisadas por agitação horizontal a 4 ms^{-1} por 5 segundos. Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi recolhido em um tubo e sua quantificação feita por comparação com padrão de massa, após eletroforese em gel de agarose 1,0% - 0,5 x TBE (1 x TBE: 44 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser FluorImage (Amersham Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.9 PCR

Os procedimentos para a condução do Nested PCR para amplificar fragmentos do gene *nifH* de comunidades de diazotróficas do solo baseiam-se no protocolo proposto Demba Diallo et al. (2004). Para amplificação inicial do gene *nifH*, utilizaram-se os *primers* FGPH19 (5'-TAC GGC AAR GGT GGN ATH G-3') (SIMONET et al., 1991) e POLR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001), gerando um produto de 429 pb. A segunda amplificação foi feita utilizando os *primers* POLF-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CTG CGA YCC SAA RGC BGA CTC-3') (POLY et al., 2001) contendo um grampo GC e AQER (5'-GAC GAT GTA GAT YTC CTG-3') (POLY et al., 2001), produzindo um produto de 320 bp (incluindo a seqüência grampo GC).

A amplificação foi feita em solução contendo, aproximadamente 50-100 ng de DNA, 2,5 µL de tampão para PCR 10 x, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. Para a segunda amplificação, 1 µL dos amplicons resultantes da primeira amplificação foram utilizados como moldes. A amplificação foi realizada em

termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf), nas seguintes condições: 30 ciclos consistindo de desnaturação a 95° C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto a 55° C para a primeira PCR e a 48° C para a segunda PCR, extensão a 72° C por 2 minutos e extensão final a 72° C por 5 minutos. Controles negativos (sem DNA) foram feitos em todas as amplificações. A quantificação dos resultantes foi feita por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 x – gel e tampão de corrida), utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (Amersham Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.10 DGGE

Para separação dos *amplicons* do gene *nifH* foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida:bisacrilamida 8 % (37,5:1, m:m), foram preparados com gradiente desnaturante variando de 20 a 70 %, utilizando-se uma solução desnaturante 100 %, contendo 7 M de uréia e 40 % de formamida e uma solução 0 %, sem uréia e formamida (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60° C constantes, por 4 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão de TAE 0,5 X (10 mM Tris-acetato e 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução de 10 % de ácido acético glacial por 15 minutos em agitador horizontal. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada, imerso em solução de metanol 50 % por 15 minutos, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000, v:v) durante 30 minutos, em agitador horizontal, no escuro. Após a coloração, a imagem do gel foi capturada utilizando-se um densitômetro a laser FluorImager (GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare).

3.11 Análise dos dados

A similaridade entre as estruturas de comunidades de diazotróficas foi determinada com base na presença ou ausência de amplicons detectados após DGGE.

Os géis foram analisados utilizando-se o programa *Diversity Database* para determinação da riqueza de amplicons. O agrupamento hierárquico foi realizado por meio do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

Com o objetivo de verificar a associação da variabilidade dos perfis de bandejamento do gene *nifH* (para bactérias fixadoras de N_2), procedeu-se uma análise de escala multidimensional (*Non-metric Multidimensional Scaling* - NMDS). O princípio da análise passa por aproveitar os valores de similaridade entre as amostras para o cálculo de coordenadas num espaço de ordenação utilizando-se o programa WinKyst e o coeficiente de similaridade de Jaccard. Subsequentemente uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as áreas estudadas utilizando o mesmo programa.

3.12 Avaliação da atividade da nitrogenase

Para comprovar a presença da fixação biológica de nitrogênio foi realizada uma metodologia que avalia a redução do acetileno a etileno (ARA), (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN; BURRIS, 1967) mostrando a sensibilidade da enzima nitrogenase, responsável por esta redução e com isso indicar a presença ativa de diazotróficos.

Os solos utilizados foram os mesmos da coleta feita para análise microbiológica do solo descrita no item 3.6.2. Contudo, foram utilizadas 3 repetições de cada tratamento, representado pela caatinga, mamona-50 anos e mamona-10 anos, além de 3 provas em branco que consiste na ausência de solos. Estas amostras de solo, com suas respectivas densidades calculadas, foram colocadas em recipiente de vidro 800 mL, hermeticamente lacrados e instantaneamente foi injetado gás acetileno na proporção de 10 % do volume total. No mesmo momento foi retirada uma quantidade de 10 mL de gás de cada frasco e analisado, correspondendo ao tempo inicial. Após 8 horas de incubação a 25° C, amostras de gás foram retiradas dos frascos e todas elas, incluindo as do tempo inicial foram analisadas em cromatógrafo a gás TRACE-Termo analítica Science com coluna empacotada-POROPAK-N, quanto à formação de etileno.

3.13 Biomassa microbiana do solo

Para a quantificação de carbono e nitrogênio microbianos do solo via úmida pelo método da extração-fumigação-FE (VANCE et al. 1987), foram utilizados os solos da caatinga (testemunha), de mamona pura (10 anos) e de mamona consorciada com milho (50 anos). Para esta análise foram escolhidas 2 profundidades que se referem a camada 0-10 e 10-20 cm. As amostras de solo tiveram um ajuste na umidade, na qual a capacidade total de retenção de água (capacidade de campo) foi ajustada para 60 %. As amostras de solo foram peneiradas e incubadas por 24 h a -0,03 MPa na presença de clorofórmio e respectivos controles e então extraídas com K₂SO₄ 0,5 M e filtradas. Os extratos foram analisados quanto ao teor de C orgânico, sendo que a biomassa microbiana é dada pela diferença entre os valores obtidos nas amostras fumigadas e as não fumigadas (Equação 3), com fatores de correção de respectivamente $k_{EC} = 0.35$ (SPARLING, 1992) para o C microbiano.

$$BMS - C = \frac{(C_F - C_{NF})}{K_C} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

BMS-C = carbono da biomassa microbiana do solo (mg kg⁻¹ TFSA)

CF e CNF = carbono nas amostras fumigadas e não fumigadas

KC = fator de correção (0,33)

O nitrogênio foi determinado pelo método da ninhydrina (JOERGENSEN e BROOKES, 1990; JOERGENSEN, 1996). Usando-se pipeta automática foi adicionado 0,6 mL dos extratos de K₂SO₄ em tubos de ensaio de 20 mL, em seguida adicionado 1,4 mL de solução tampão ácido cítrico. Em ambiente ventilado (capela) foi adicionado 1 mL de reagente de ninhydrina, e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. O método da FE pode ser aplicado a uma grande variedade de solos, inclusive naqueles com baixo pH, alto teor de matéria orgânica fresca ou com baixo teor de umidade.

Foram feitas coletas dos solos em 5 linhas nos tratamentos de mamona 10 e 50 anos. Entre cada linha foram coletados 4 pontos que servirão como repetições. As amostras foram coletadas nos mesmos tratamentos citados no item anterior, utilizando trado até 20 centímetros de profundidade e posteriormente foram lacradas em sacos plásticos, armazenadas em câmara fria e as etapas laboratoriais com a metodologia do FE foram então realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental-CENA-USP em Piracicaba. Esta análise auxiliará na interpretação de dados das emissões dos gases CO₂, CH₄ e N₂O e nos estoques de C e N. O Cálculo de N, baseou-se na equação 4.

$$\text{BMS-N} = \frac{(N_F - N_{NF}) \times V_{\text{extrator}} \times 14}{\text{Coef. absorb.}} \times 100$$

Eq 4

Onde:

BMS-N = nitrogênio da biomassa microbiana do solo (mg kg⁻¹ TFSA);

NF e NNF = nitrogênio nas amostras fumigadas e não fumigadas;

V_{extrator} = volume do extrator usado na digestão da amostras F e NF;

14 = peso molecular do nitrogênio;

Coef. Absorb.= valor médio da relação entre absorvância de cada padrão e a sua concentração.

4 Resultados e discussão

4.1 Textura do solo

A textura do solo é colocada na Tabela 1 em função do aporte de argila, silte e areia. Em conjunto, uma relação do pH também é mostrada.

Tabela 1 - Textura (%) e pH em água no perfil de solo (0-30 cm) nas áreas de estudo de mamona

Tratamentos	Camadas (cm)	Argila%	Silte%	Areia%	pH (água)
Mamona-50 anos	0-5	53	15	32	6.1
	5-10	53	20	27	6.3
	10-20	53	16	31	6
	20-30	56	14	30	6.3
	Médias	54	16	30	6.2
Mamona-20 anos	0-5	54	14	32	6.4
	5-10	55	15	30	6.3
	10-20	54	15	31	6.4
	20-30	48	19	33	6.6
	Médias	52	17	31	6.4
Mamona-10 anos	0-5	51	12	37	6.5
	5-10	53	17	30	6.3
	10-20	55	15	30	6.4
	20-30	50	18	32	6.4
	Médias	52	16	34	6.4
Caatinga	0-5	52	15	33	6,5
	5-10	54	16	30	6.0
	10-20	58	12	30	6.0
	20-30	53	19	28	6.7
	Médias	64	16	30	6.3

A textura ou granulometria refere-se à proporção de argila, silte e areia do solo. Dessas frações, a argila é a que possui maior superfície específica de natureza coloidal com alta retenção de cátions e adsorção de fósforo. A fração argila representa a maior parte da fase sólida na maioria dos solos e é constituída de uma gama variada de

minerais (minerais de argila) que apresentam cargas elétricas negativas responsáveis pela capacidade de troca de cátions (CTC).

Os valores do pH não sofreram alterações estatísticas significativas entre os tratamentos de mamona e na caatinga, estando próximos da neutralidade. Esses valores são considerados como ótimos para o desenvolvimento de microrganismos, como fungos e bactérias, podendo variar numa escala de 3 a 9 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

As porcentagens de argila superaram as de silte e areia em todos os tratamentos, mostrando que trata-se de um solo de textura argilosa segundo classificação da Embrapa (2007).

A textura do solo apresenta uma relação direta com a proteção física e química da matéria orgânica do solo, portanto a sua determinação torna-se importante para verificar a homogeneidade entre as áreas de estudo. Foi observado um aumento nos teores de argila na área de caatinga em relação às demais áreas deste estudo, podendo exercer influências diretas na dinâmica matéria orgânica, visto que esta tende a se acumular em solos com maior teor de argila (SCHULTEN; LEINWEBER, 2000; ROSCOE; MACHADO, 2002).

4.2 Estoques de carbono no solo

Os estoques finais de carbono no solo nas profundidades principais (0-30 cm) foram obtidos pela relação entre profundidade do solo, teor de carbono e densidade relativa nos tratamentos de caatinga, mamona com 10, 20 e 50 anos de cultivo e estão relacionados na Tabela 2.

Todos os valores, das densidades, teores de C e estoques de C não sofreram variações estatísticas entre os tratamentos de mamona, diferenciando apenas nos valores da caatinga, devido ao maior aporte de matéria orgânica encontrado neste tratamento e maiores valores de densidade.

De acordo com Streck *et al.*, (2004) altos valores na densidade encontrada na floresta nativa são considerados aceitáveis em função do não revolvimento deste solo,

da estabilidade de agregados e da quantidade de matéria orgânica na forma lábil e pela compactação superficial do solo.

Tabela 2- Estoques de C em função da densidade e do teor de C

Tratamentos	Camada (cm)	Densidade (g cm^{-3})	Teor de C (g kg^{-1})	Estoque de C (Mg ha^{-1})
Mamona 50 anos	0-5	1,17 a	1,50 a	8,75
	5-10	1,18 a	1,50 a	8,86
	10-20	1,22 a	1,44 a	17,52
	20-30	1,12 a	1,19 b	13,39
	0-30			48,52 A
Mamona 20 anos	0-5	1,07 a	1,39 a	7,48
	5-10	0,81 b	1,41 a	5,72
	10-20	1,27 a	1,43 a	18,14
	20-30	1,04 a	1,25 b	12,90
	0-30			44,24 A
Mamona 10 anos	0-5	0,99 b	1,53 a	7,60
	5-10	1,28 a	1,51 a	9,65
	10-20	1,24 a	1,37 a	17,02
	20-30	1,13 a	1,26 b	14,30
	0-30			48,57 A
Caatinga	0-5	1,14 a	5,17 a	29,55
	5-10	1,02 b	3,56 a	18,17
	10-20	0,95 b	2,62 b	24,95
	20-30	0,97 b	1,83 b	17,71

Médias das colunas seguidas das mesmas letras, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Numericamente, os estoques de C na caatinga superam os demais tratamentos, chegando ao valor absoluto de 90 Mg ha^{-1} , mostrados na figura 9.

Nos demais tratamentos 10, 20 e 50 anos de cultivo, não houve diferença significativa entre os estoques de carbono no solo chegando ao maior valor absoluto de 48 Mg ha^{-1} . Estes valores são muito próximos aos citados por Rossato et al (2007) de 54 Mg ha^{-1} em solos com cultivo de milho e 86 Mg ha^{-1} na floresta nativa que se refere a uma transição do cerrado para a caatinga na região central da Bahia em solos que também não possuem insumos agrícolas.

Figura 9- Estoque de carbono no solo pelo tipo de cultivo de mamona

As camadas mais superficiais do solo são mais sensíveis às variações do estoque de C, devido à ação dos microrganismos na matéria orgânica do solo. Nas camadas mais profundas o estoque de C contribui de forma mais estável para o acúmulo deste elemento no solo, o que pode ser explicado pelo menor efeito dos fatores climáticos, por fatores inerentes do resíduo, e pela menor chance de perturbação do solo (OLIVEIRA, et al. 2008).

Pinheiro et al. (2007), trabalhando com estoques de C no solo com cana-de-açúcar no semi árido nordestino, encontrou valores de 50 Mg ha⁻¹ nos tratamentos de cana sem queima contra 100 Mg ha⁻¹ na floresta nativa, mostrando uma alta relação com os estoques de C encontrados nos solos de mamona e da floresta nativa da região. Esse autor destaca também a importância em termos de produtividade agrônômica para solos com elevados teores de C.

Assis et al., (2006) sustenta que os teores de C tendem a diminuir com o cultivo do solo quando comparado à mata nativa. Machado et al., (2003) salienta que os teores de C superficiais tendem a diminuir, havendo pouca alteração em profundidades maiores.

Neves e Feller et al. (2004), mostraram que o estoque de C e N em solos nativos de cerrado e caatinga também ausentes de adubação, diminuía com o seu revolvimento para introdução de pastagem, atribuindo valores mais baixos aos solos de plantio convencional em relação aos de plantio direto.

Diversos autores têm demonstrado que a rotação envolvendo gramíneas ou espécies arbóreas não leguminosas e leguminosas fixadoras de N_2 tendem a incrementar os estoques de C do solo em diferentes sistemas produtivos, devido à maior estabilização do C no solo proporcionado pelo N adicionado biologicamente (RESH, 2002; SISTI et al., 2004).

Por não haver aplicação de insumos agrícolas nos solos com tratamentos de mamona, pode-se dizer que até o momento presente, houve estocagem de carbono no solo, permanecendo em equilíbrio, mostrando-se constante com o passar dos 50 anos de plantio de mamona e com isso, subentende-se que um dos principais fatores responsáveis por esta manutenção possa ser a agregação do solo realizada pela ação de microrganismos (fungos e bactérias) e substâncias orgânicas proveniente das raízes (KIEHL, 1979).

4.3 Estoques de nitrogênio no solo

Os estoques finais de nitrogênio no solo nas profundidades principais (0-30 cm) foram obtidos pela relação entre profundidade do solo, teor de carbono e densidade relativa nos tratamentos de caatinga, mamona com 10, 20 e 50 anos de cultivo e estão relacionados na Tabela 3.

Os estoques de N não sofreram variações estatísticas entre os tratamentos de mamona, diferenciando apenas nos valores da caatinga.

A presença de gramíneas, como o milho, em sistemas de culturas determina o aporte de N ao sistema devido à fixação biológica de N_2 realizada por estes vegetais, o que aumenta a disponibilidade deste nutriente para o solo em consórcio ou em sucessão, favorecendo a produção de fitomassa e, por consequência, maior aporte de C e N ao solo (NELSON et al. 1982).

Tabela 3- Estoques de N no solo em função da densidade e do teor de N

Tratamentos	Camada (cm)	Densidade (g cm ⁻³)	Teor de N (g kg ⁻¹)	Estoque de N (Mg ha ⁻¹)
Mamona 50 anos	0-5	1,17 a	0,16 a	0,97 a
	5-10	1,18 a	0,17 a	0,98 a
	10-20	1,22 a	0,16 a	1,97 b
	20-30	1,12 a	0,14 a	1,55 b
	0-30			5,48 a
Mamona 20 anos	0-5	1,07 a	0,17 a	0,90 a
	5-10	0,81 b	0,17 a	0,69 a
	10-20	1,27 a	0,17 a	2,20 c
	20-30	1,04 a	0,16 a	1,67 b
	0-30			5,47 a
Mamona 10 anos	0-5	0,99 b	0,19 a	0,93 a
	5-10	1,28 a	0,18 a	1,13 a
	10-20	1,24 a	0,17 a	2,05 b
	20-30	1,13 a	0,16 a	1,77 b
	0-30			4,12 a
Caatinga	0-5	1,14 a	0,42 b	2,42 c
	5-10	1,02 b	0,33 b	1,66 b
	10-20	0,95 b	0,34 b	2,24 c
	20-30	0,97 b	0,35 b	1,64 b
	0-30			7,96 b

Médias das colunas seguidas das mesmas letras, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com isso, obtém-se a figura 10, que representa determinados valores dos estoques de N.

Os tratamentos de 10, 20 e 50 anos de cultivo de mamona chegaram ao valor absoluto de 5,3 Mg ha⁻¹, sendo superado pela caatinga que chega ao valor absoluto de 8 Mg ha⁻¹. A ausência de insumos agrícolas e o tratamento ideal dos solos contribuem para que o estoque de nitrogênio no solo se mantenha constante no decorrer dos 50 anos de cultivo.

Da mesma forma que os estoques de C no solo, Rossato et al (2007), encontraram valores próximos para os estoques de N em seus solos com cultivo de milho chegando a 6 Mg ha⁻¹ e 9 Mg ha⁻¹ na floresta nativa.

Figura 10- Estoques de nitrogênio no solo pelo tempo de cultivo de mamona

Uma possível explicação para a manutenção de N nos solos com cultivo de mamona nos 50 anos decorridos seria a fixação biológica de N_2 por bactérias diazotróficas não simbióticas e queda e decomposição das folhas mensalmente, desde que estas permaneçam nas entrelinhas durante todo o cultivo de mamona (SEVERINO, 2005).

PINHEIRO et al. (2007) também trabalhando com estoques de N no solo para cana-de-açúcar no semi-árido, encontrou valores de 6 Mg ha^{-1} nos tratamentos de cana sem queima e de 9 Mg ha^{-1} na floresta nativa da região para a camada de 30 cm. Segundo este autor, considerando-se os sistemas de manejos e o clima da região, estes valores de estoques de N podem desempenhar um papel fundamental na dinâmica da MOS e na produtividade agrícola.

Teixeira et al. (1994) e Lovato et al. (2004) também observaram boa relação entre o N adicionado ao solo pelos sistemas de culturas e a variação nos estoques e que 50 % do N adicionado foi retido como N total em sistema plantio direto.

Contudo, maiores estoques de N-total em sistemas de culturas com gramíneas também foram observados por Bayer e Mielniczuk (1997), Lovato et al. (2004) e Diekow et al. (2005). Semelhante ao que ocorre com a dinâmica de acúmulo de C-orgânico no solo, o N-total é determinado pela relação entre a taxa de adição de N ao solo e a de perda (DALAL e MAYER, 1986). Dessa forma, os maiores estoques de N nos sistemas com gramíneas ou algumas oleaginosas é devido à maior entrada de N no sistema

solo-planta, o qual é proveniente da fixação biológica de N_2 realizada por estes vegetais.

Entretanto, para um acúmulo de N no solo, ou seqüestro de $N-N_2O$, práticas de manejo como a retirada do uso de adubação nitrogenada e o uso de leguminosas ou gramíneas em consórcio é de fundamental importância para aumentar o conteúdo de MOS e mitigar gases de efeito estufa.

4.4 Relação C: N

A maior relação C: N foi encontrada nos solos do perfil testemunha (caatinga), devido ao maior aporte de matéria orgânica no solo. Os demais tratamentos mantiveram seus estoques de carbono e nitrogênio constantes com o decorrer do tempo, portanto a relação C: N não se alterou.

As pequenas variações nos estoques de C e N ocorrem preferencialmente na camada superior do solo (0-10 cm). Porém, as camadas inferiores também representam importantes reservatórios destes elementos. Dependendo do sistema de manejo do solo, que afeta a distribuição radicular e a atividade da fauna do solo, as camadas mais profundas funcionam como um dreno ou fonte de dióxido de carbono atmosférico.

A redução da relação C: N com a profundidade é devido à diminuição da matéria orgânica particulada (MOP), a qual possui maior relação C: N que a matéria orgânica associada aos minerais (MOAM) (DIERKOW 2003). A MPO possui maior relação C: N por ainda possuir muitas características dos resíduos das culturas utilizadas, enquanto a MOAM é um material que pode ter sofrido tais transformações pela microbiota do solo, o que diminuiu a sua relação C: N.

4.5 Massa seca, teores e estoques de C e N dos resíduos culturais

Os valores dos teores de C e N obtidos e a massa seca, que se refere ao peso das folhas de mamona após a lavagem e secagem estão agrupados na Tabela 4.

Tabela 4- Valores de massa seca de folhas de mamona

Tratamentos	Março	Abril	Maio
Massa seca (mg ha ⁻¹)			
Mamona-1	10,2 a	8,6 a	7,6 b
Mamona-2	9,9 a	8,7 a	7,9 b
Mamona-3	9,7 a	9,0 a	6,5 b
Mamona-4	9,9 a	8,3 a	6,2 b
Mamona-5	10,0 a	8,0 a	7,6 b
Desvio	± 0,2	± 0,4	± 0,8
Média	9.9	8.5	7.2
Teores de C (g kg ⁻¹)			
Mamona-1	306,45 a	245,34 b	178 c
Mamona-2	297,34 a	222,4 b	177,65c
Mamona-3	287,12 a	265,43 b	166,49 c
Mamona-4	312,16 a	199,87 b	165,04 c
Mamona-5	325,78 a	229,67b	167,55 c
Desvio	± 14,6	± 24	± 6,2
Média	305,77	232,54	170,34
Teores de N (g kg ⁻¹)			
Mamona-1	5,22 a	4,83 b	3,03 c
Mamona-2	5,68 a	3,63 b	3,00 c
Mamona-3	5,92 a	4,18 b	3,56 b
Mamona-4	4,89 a	4,10 b	3,76 b
Mamona-5	5,25 a	4,00 b	3,56 b
Desvio	± 0,4	± 0,4	± 0,4
Média	5,39	4,15	3,38

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na mesma coluna e minúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os valores da massa seca e dos teores de C e N não sofreram variações estatísticas entre as repetições, contudo foram diminuindo até o terceiro mês.

Esses valores correspondem a uma determinada época do ciclo da mamona (início de março a final de maio), onde ocorre crescimento de suas folhas e suas respectivas perdas totais até meados do mês de outubro, onde se realiza a poda da mamona para futuro replantio. A pequena variação nestes resultados ao longo do período amostrado pode ser explicada pelo fato de se tratar do mesmo resíduo cultural em todos os tratamentos. As médias dos tratamentos nas épocas amostradas não apresentaram diferença estatística.

Em seguida, os estoques de C e N dos resíduos culturais foram calculados em função dos valores da massa seca e dos teores de C e N obtidos, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5- Estoques de C e N nos resíduos de cultura de mamona

Tratamentos	Março	Abril	Maio
Estoque de C (kg ha ⁻¹)			
Mamona-1	3,13 a	2,11b	1,35c
Mamona-2	2,94 a	1,93b	1,40c
Mamona-3	2,79 a	2,39b	1,08c
Mamona-4	3,09 a	1,66b	1,02c
Mamona-5	3,26 a	1,84b	1,27c
Desvio	± 0,2	± 0,3	± 0,2
Média	3,04	1,99	1,23
Estoque de N (kg ha ⁻¹)			
Mamona-1	0,05 a	0,04 a	0,02 a
Mamona-2	0,06 a	0,03 a	0,02 a
Mamona-3	0,06 a	0,04 a	0,02 a
Mamona-4	0,05 a	0,03 a	0,02 a
Mamona-5	0,05 a	0,03 a	0,03 a
Desvio	± 0,2	± 0,3	± 0,2
Média	0,054	0,035	0,024
Relação C: N	56,8	56,2	51,0

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os valores dos estoques de C e N das folhas de mamona não sofreram variações significativas entre as repetições, diminuindo com o decorrer dos 3 meses avaliados, mostrando uma alta relação C:N, calculado por meio das médias dos estoques de C e N, estando ausentes de diferenças estatísticas no decorrer dos meses avaliados.

A adição de quantidades elevadas de resíduos com elevada relação C: N faz com que os organismos quimiorganotróficos, que atuam na decomposição da matéria orgânica, se multipliquem gradativamente estocando e produzindo CO₂ em grande quantidade (VICTORIA et al., 1992).

A quantidade de N no material vegetal determina a velocidade da sua decomposição. Muitos estudos têm mostrado que resíduos de baixa relação C: N

decompõem-se mais rapidamente que os de relação C: N alta. Portanto, pode-se inferir como hipótese de que o fator “decomposição dos resíduos culturais” referente às folhas de mamona, não estejam contribuindo com a manutenção nos estoques de C e N nos solos já calculados. Esta manutenção pode estar mais diretamente relacionada com a fixação biológica de N_2 realizada por bactérias diazotróficas não simbióticas, presentes nos solos. Contudo, em paralelo a esta avaliação realizada nos resíduos culturais, foi feita uma análise do perfil da comunidade microbiana do solo de mamona através das novas ferramentas da biologia molecular, o DGGE, para poder confirmar esta hipótese.

Cabe ressaltar que estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio em solos com mamona, particularmente na caatinga, são raros, ausentes de referências bibliográficas.

4.6 Fluxos de gases do efeito estufa (GEE)

Foram utilizados no processo de incubação em laboratório os produtos conhecidos como:

- Torta ou farelo de mamona (adubo orgânico);
- Solo de mamona misturado com farelo (simulação da adubação nitrogenada);
- Solo de mamona (testemunha).

No intuito de avaliar a atividade respiratória dos microrganismos associados com a emissão de gases do efeito estufa, os dados foram obtidos e calculados baseando-se na somatória das médias das repetições.

O CO_2 é produzido essencialmente pela respiração das raízes das plantas e pela decomposição da matéria orgânica promovida pela ação dos microrganismos. No caso de solos desprovidos de vegetação, a produção de CO_2 em seu interior é totalmente relacionada à atividade microbiana, pela temperatura e pela umidade do solo, atributos com grande variabilidade temporal e espacial, que guarda relação direta com as condições climáticas e topográficas do local onde o gás está sendo produzido (KANG et al., 2000).

Os resultados das concentrações respirométricas de C- CO_2 dos 3 produtos analisados estão expressos na Figura 11.

Figura 11- Acumulado nas taxas de emissão de C-CO₂ em mg m⁻² de solo h⁻¹ nos 15 dias de incubação

O valor acumulado da emissão de C-CO₂ para o tratamento de solo foi menor quando comparado ao solo com farelo e apenas farelo, estabilizando-se na faixa de 50 mg m⁻² de solo h⁻¹ após 15 dias de incubação.

Para o tratamento de solo a equação do gráfico que descreveu as taxas de emissões acumuladas de C-CO₂ foi $y = 23,434 \ln(x) - 1,9188$, com valor de $r = 0,98$ com diferença significativa para os demais tratamentos, com $p < 0,01$.

Este fato descreve a menor atividade microbiológica, no que se refere à respiração, pelo fato desse tratamento conter menor teor de matéria orgânica representada pelo farelo ou torta de mamona.

Para o tratamento de solo com farelo de mamona houve um maior crescimento no acumulado da emissão de C-CO₂, quando comparado com os demais tratamentos, chegando a 160 mg m⁻² de solo h⁻¹ nos 15 dias de incubação, mostrando que não houve estabilidade até este período. Para este tratamento a equação do gráfico é de $y = 75,462 \ln(x) - 17,563$, com $r = 0,98$ e $p < 0,01$.

Dessa forma, quando há mistura do farelo de mamona (adubo orgânico) no solo, os valores acumulados de C-CO₂ são maiores quando comparados ao solo sem adubação orgânica, mostrando que a respiração heterotrófica da microbiota do solo tem atividade respiratória elevada nessas condições (PAUL; CLARK, 1989), justificando a maior emissão desse gás.

Para o tratamento de farelo, cujos valores acumulados nas emissões de C-CO₂ foram superiores quando comparados ao tratamento de solo e inferiores quando comparados aos valores de solo com farelo, chegando a 120 mg m⁻² de solo h⁻¹ com 15 dias de incubação, valores semelhantes aos encontrados por Severino et al. (2004), de 140 mg m⁻² de solo h⁻¹. Pode-se dizer que após este período de incubação os valores do tratamento de farelo também não se estabilizaram. Para este tratamento a equação do gráfico é $y = 50,502 \ln(x) - 5,5687$ com $r = 0,98$ e $P < 0,01$.

No que se refere à emissão de GEE é de extrema importância o conhecimento das técnicas de manejo do solo e da utilização de adubação nitrogenada que influenciam na respiração dos microrganismos. Com relação à utilização de biocombustível, substituindo o diesel do petróleo, deve-se conhecer todas as etapas de sua produção, visando a utilização de compostos nitrogenados à base de substâncias orgânicas, como é o caso do emprego do farelo de mamona na adubação dos solos (ZAGONEL et al. 2001).

O N₂O é um importante gás de efeito estufa, resultante dos processos microbiológicos de nitrificação e desnitrificação que decorrem da adição de fertilizantes nitrogenados quando aplicados ao solo. Embora as emissões de N₂O provenientes do cultivo de matérias-primas para a produção de biocombustíveis não sejam elevadas, em termos absolutos, o seu grande potencial de aquecimento global, 296 vezes superior ao do CO₂, ressalta a importância desse gás no balanço global das emissões de gases de efeito estufa (COSTA, 2009). A concentração atmosférica global de N₂O aumentou de um valor pré-industrial de cerca de 270 ppb para 319 ppb, em 2005, sendo que um terço de todas as emissões é antrópica, devendo-se principalmente à agricultura. O IPCC considera que cerca de 1 % de todo o nitrogênio aplicado na forma de fertilizantes nitrogenados é perdido para a atmosfera como N₂O (IPCC, 2008).

Os resultados das concentrações respirométricas de N-N₂O dos 3 produtos analisados estão expressos na Figura 12.

Figura 12- Acumulado nas taxas de emissão de N-N₂O em mg m⁻² de solo h⁻¹ nos 15 dias de incubação

O valor acumulado na taxa da emissão de N-N₂O para o tratamento de solo, ausente de torta de mamona, não teve resultados significativos, mostrando que na ausência de adubo orgânico o solo não emitiu N-N₂O significativamente quando comparado aos demais tratamentos.

As emissões de N₂O predominam quando o conteúdo de água no solo é de 30%, pois quando o conteúdo de água é inferior a 30% ocorrem preferencialmente emissões de NO e condições de alta umidade o N pode ser reduzido até N₂ (DRURY; McKENNEY; FINDLAY, 1992).

Quanto ao tratamento de farelo (torta de mamona), as emissões acumuladas no período de incubação, demonstram que o adubo orgânico é responsável pela alta emissão de N-N₂O, próximo de 490 mg m⁻² de solo h⁻¹. O farelo de mamona chamado de “adubo orgânico”, nutre o solo, pois sua matéria prima principal possui compostos nitrogenados (SEVERINO, 2005). Para este tratamento a equação que descreveu as emissões acumuladas foi $y = 167,4 \ln(x) + 8,7943$ com $r = 0,97$ e $P < 0,01$.

No tratamento de solo com farelo as taxas nas emissões foram maiores ainda, aproximando ao valor de 600 mg m⁻² de solo h⁻¹ nos 15 dias de incubação.

A emissão de N₂O para a atmosfera depende tanto das concentrações disponíveis de NH₄⁺ e NO₃⁻, quanto de fatores como temperatura, pH e umidade do solo (LAL; KIMBLE; LEVINE; 1995). Assim, solos fertilizados com N são fontes de

significativa contribuição para a emissão total de N_2O (HARRISON, WEBB, 2001). Embora seja uma adubação orgânica, o farelo de mamona contribui também para as emissões desse gás, porém muito inferior aos insumos agrícolas e fertilizantes de origem industrial (SEVERINO, 2005).

Contrastando-se o uso de fontes de matéria orgânica, como é o caso da torta de mamona, com a adubação mineral, uma vantagem do uso destes resíduos em relação à aplicação de fertilizantes químicos é a liberação gradual dos nutrientes à medida que são demandados para o crescimento da planta. Todavia, se os nutrientes forem imediatamente disponibilizados no solo, como ocorre com os fertilizantes químicos, podem ser perdidos por volatilização (principalmente o nitrogênio), fixação (fósforo) ou lixiviação (principalmente o potássio). Por outro lado, a mineralização de alguns materiais orgânicos pode ser excessivamente lenta, fazendo com que os nutrientes não sejam disponibilizados em quantidade suficiente e o crescimento da planta seja limitado por deficiência nutricional (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

4.7 Biomassa microbiana no solo

4.7.1 Carbono da biomassa microbiana do solo

O C-microbiano do solo foi maior para o tratamento de caatinga, pois se refere à floresta da região, onde não há perturbação do solo, nem revolvimento do mesmo para plantação de culturas, com isso a matéria orgânica, tanto na camada superior (0-10 cm) quanto na camada mais inferior (10-20 cm) se preserva, favorecendo a BMS, proporcionada pela ausência de preparo do solo, diversidade florística e favorecimento da preservação das hifas fúngicas do solo (NOGUEIRA et al. 2000).

A redução da fração mais ativa da matéria orgânica do solo afeta diversas funções no solo, como, por exemplo, a manutenção da produção de polissacarídeos fundamentais ao processo de agregação (GOLCHIN; BALDOCK; OADES, 1997).

Com isso, há variações significativas na quantidade de C-orgânico, tendo valor absoluto de 1200 kg ha^{-1} na camada 0-10 cm e 950 kg ha^{-1} na camada 10-20 cm (Figura 13).

Figura 13- Valores de C-microbiano em solos da caatinga, mamona pura (10 anos) e mamona consorciada com milho (50 anos).

Os valores de C-microbiano para o tratamento de mamona pura (10 anos) não sofreram variações significativas entre as camadas 0-10 cm e 10-20 cm, chegando a 500 kg ha^{-1} e 480 kg ha^{-1} respectivamente. Esse valor é inferior ao da caatinga e se justifica pelo fato de ter ocorrido o preparo do solo para implantação da cultura de mamona, havendo redução no grau de proteção física da matéria orgânica do solo (MOS), acarretando no aumento da degradação dos agregados e decomposição das substâncias húmicas conseqüentemente, diminuindo os estoques de C e N do solo e da biomassa microbiana de carbono (MICHEL et al, 1995).

Para o tratamento de mamona consorciada com milho (50 anos), não houve diferença significativa entre os valores de C-microbiano das camadas 0-10 e 10-20 cm, porém esses valores são inferiores quando comparado aos da caatinga e ausente de diferenças estatísticas aos de mamona pura, chegando aos valores absolutos de 390 kg ha^{-1} e 350 kg ha^{-1} respectivamente nas camadas 0-10 e 10-20 cm. Este valor é inferior ao da caatinga também por ter ocorrido um revolvimento na camada do solo durante a plantação da cultura de mamona.

A BMS é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo sua influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem de

carbono e nutrientes minerais, ou seja, na liberação e imobilização de nutrientes nos ecossistemas terrestres (FEIGL et al., 1998; JENKINSON; LADD, 1981).

Vale destacar que estudos nestes solos de caatinga são recentes e que a biomassa microbiana pode estar ainda em adaptação às condições do solo sob manejo. Por fim, deve-se levar em consideração que apenas 15 a 30% da biomassa microbiana do solo é ativa (MACDONALD, 1986) e que o restante dos microrganismos do solo ocorre em formas latentes ou inativas, com baixa atividade metabólica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002), o que pode causar dificuldades adicionais na interpretação dos resultados.

4.7.2 Nitrogênio da biomassa microbiana do solo

Os valores N-microbiano do solo foram significativamente menores do que os de C-microbiano, conforme mostra a relação C: N na tabela no item posterior.

Não houve diferença significativa entre os valores de N-microbiano entre as camadas de todos os tratamentos, respeitando os valores que foram maiores na caatinga com 200 kg ha⁻¹ (Figura 14).

Figura 14- Valores de N-microbiano nos solos da caatinga, mamona pura (10 anos) e mamona consorciada com milho (50 anos).

No tratamento de mamona pura (10 anos), o valor chega a 90 kg ha⁻¹ na camada 0-10 cm, sendo superior ao da mamona consorciada com milho (50 anos) que foi de 18

kg ha⁻¹. Da mesma forma que para o carbono, esse valor também é inferior ao encontrado na caatinga, pelo motivo da ocorrência de um revolvimento na camada do solo ocasionando uma perturbação na proteção física do mesmo.

Estes valores de N-microbiano também corroboram com os mostrados por Maia (2008), que, trabalhando com solos de gramíneas de sistema agropastoris do semi-árido cearense encontrou valores variando entre 10 e 20 kg ha⁻¹.

Acredita-se que os menores valores de N-microbiano encontrados no tratamento de mamona 50 anos devem-se a competição pelo N entre a comunidade microbiana e as culturas de milho e de mamona. O milho, por ser planta de ciclo fotossintético C₄, tem grande capacidade de imobilização deste elemento, com produção de matéria seca acima e abaixo da superfície do solo maior que a da mamona (VANCURA et al. 1973).

Além do aporte de resíduos orgânicos em superfície, as gramíneas promovem a liberação de exsudatos ricos em carboidratos e proteínas e que estão mais disponíveis para os microrganismos (SILVA; MIELNICZUK, 1997). Este fato pode ser explicado pela alta relação C: N das gramíneas (representado pelo tratamento de mamona-consórcio), pois os microrganismos utilizam o carbono da palha do milho para a biossíntese e, como fonte de energia, eles acabam imobilizando o N mineral do solo, diminuindo a disponibilidade para a mamona (AITA et al., 2001).

Quando comparados a solos bem preservados ou de vegetação natural, os menores valores da BMS são normalmente encontrados em áreas degradadas pela mineração ou florestas queimadas, seguidos por solos sujeitos à inundação, cultivo intenso ou contaminação com metais pesados (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

É importante ressaltar que a avaliação dos resultados de N-microbiano deve ser criteriosa, uma vez que uma alta atividade biológica pode ser resultado tanto de um grande reservatório de C e N lábeis, em que a decomposição é intensa (por exemplo, áreas de vegetação nativa), como da oxidação da MOS proveniente da quebra de agregados pela ação antrópica, ou ainda, como resultado da adição momentânea de resíduos orgânicos. Assim, altos teores de N microbiano podem indicar tanto uma situação de distúrbio quanto uma alta produtividade do ecossistema (ISLAM; WEIL, 2000).

4.7.3 Relação C: N da biomassa microbiana no solo

A relação C: N nos tratamentos de caatinga e de mamona pura não sofreram diferenças significativas, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6- Relação C: N da biomassa microbiana dos solos da caatinga, mamona pura (10 anos), mamona consorciada com milho (50 anos)

Tratamento	Camada (cm)	Relação C: N
Caatinga	0-10	6,3
	10-20	5,2
Mamona pura	0-10	5,2
	10-20	5,9
Mamona consorciada com milho	0-10	20,9
	10-20	20,3

Contudo, para mamona consorciada com milho, esse valor passa a ser significativamente maior chegando a 20. Esse fato pode ser justificado pelo fato da degradação do milho ser mais dificultada pela presença de lignina (PANIKOV, 1999).

Além disto, a biomassa microbiana pode imobilizar, do início ao fim do ciclo do milho, alta quantidade de N mineral oriundo do solo e do N aplicado, especialmente no sistema semeadura direto (VARGAS et al., 2005). Desta forma, pode resultar em menor acúmulo de N na parte aérea do milho e, segundo Vargas et al. (2005), a biomassa microbiana passa a atuar mais como agente de mineralização do N orgânico do solo do que como fonte de N potencialmente mineralizável, ainda mais quando houver elevado aporte de resíduos com alta relação C:N, conforme foi verificado nos tratamentos de mamona.

Por fim, a biomassa microbiana é uma fração significativa da MOS, normalmente sugerida como indicador sensível e precoce de mudanças na dinâmica da MOS e seus efeitos sobre atributos físicos e químicos, resultantes das diferentes formas de manejo e uso do solo devem ser avaliados (DALAL, 1998; JOHNSON et al., 1991; LI; ALLEN; WOLLUM II, 2004). Dessa maneira, a BMS é um indicador eficaz de alterações no solo por causas naturais e antropogênicas, antes mesmo da detecção significativa de alterações nos teores do carbono e nitrogênio orgânico total.

4.8 Avaliação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi avaliada indiretamente pela atividade de redução do acetileno, segundo método descrito por Hardy et al. (1968). Este teste avalia a atividade funcional da nitrogenase (enzima responsável pela fixação biológica de N_2) e ao mesmo tempo comprova que as bactérias fixadoras não simbióticas existentes nos solos com cultivo de mamona estão em atividade permitindo, então, a estocagem de nitrogênio estes solos.

O gene *nifH* codifica a Fe-proteína que faz parte do complexo nitrogenase, o qual é responsável pela fixação biológica do nitrogênio (TEIXEIRA, 1997), e está presente na maioria das bactérias diazotróficas.

A nitrogenase é a enzima responsável pela redução de acetileno a etileno, portanto, o valor obtido no período considerado de incubação, expressa a quantidade de etileno produzido a partir da injeção de acetileno 10 % e incubado num período de 8 horas. Os valores de ARA obtidos por hora estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7- Atividade da redução de acetileno (ARA) nos tratamentos de mamona.

Tratamentos	Repetições	ARA (nmol de C_2H_4 g ⁻¹ h ⁻¹)
Mamona 50 anos	1	3,88 a
	2	3,67 a
	3	3,84 a
	Média ± DP	3,75 ± 0,4
Mamona 10 anos	1	3,66 a
	2	3,54 a
	3	3,98 a
	Média ± DP	3,71 ± 0,2
Caatinga	1	3,52 a
	2	3,33 a
	3	3,23 a
	Média ± DP	3,30 ± 0,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os valores de ARA obtidos não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados que por sua vez, são semelhantes aos encontrados por Zarea et

al. (2009) de $4,2 \text{ nmol de C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em solos com plantio de milho. Uma classificação feita por este mesmo autor indica que a produção de ARA varia entre 2 a $5 \text{ nmol de C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em solos com gramíneas e oleaginosas. Esta faixa determinada de valores é atribuída à presença de bactérias fixadoras de N_2 não simbióticas.

Desta forma, pode-se perceber um resultado positivo para o ARA em todos os tratamentos de mamona e com isso, comprovar a atividade funcional das diazotróficas neste solo. No entanto, além da permanência efetiva, estas bactérias estão executando a fixação de N_2 no solo e contribuindo para a estocagem deste elemento nos solos da caatinga com cultura de mamona.

4.9 Estrutura da comunidade de diazotróficas

4.9.1 Análise do DGGE

A diversidade microbiana pode ser definida por diversas formas incluindo critérios filogenéticos, metabólicos e genômicos (KELLER; ZENGLER, 2004). As técnicas baseadas em biologia molecular, aplicadas neste estudo, permitiram detectar a presença das bactérias diazotróficas e conhecer o perfil da estrutura da comunidade nos diferentes tratamentos em um curto período de tempo.

O gene *nifH* foi selecionado, pois está presente na maioria dos sistemas biológicos capazes de fixar nitrogênio atmosférico, bem como apresenta regiões altamente conservadas entre a maioria das bactérias diazotróficas, no entanto, o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase vem crescendo nos últimos anos tornando-se um dos maiores bancos de dados não ribossomais de organismos não cultivados (Zehr et al., 2003).

Análises da diversidade de bactérias diazotróficas do solo, baseadas na clonagem e no sequenciamento de genes *nifH*, têm obtido estimativas bastante variáveis. Izquierdo; Nüsslein (2006) utilizando sequências do gene *nifH* para estimar a riqueza de espécies de bactérias diazotróficas no solo detectaram cerca de 20 a 21 espécies em um solo de floresta tropical, 20 espécies em um solo da região da Tundra Ártica e de 11 a 12 espécies em um solo sob pastagem cultivada em clima temperado. Portanto, estudos envolvendo o gene *nifH* em solos da caatinga são extremamente

escassos, destacando-se a importância de novas pesquisas com este genes nestas regiões.

Para este estudo, o DNA foi recuperado de todas as amostras de solo de caatinga (testemunha), mamona com 50 anos de plantio e de mamona com 10 anos de plantio. Todas as amostras de DNA (quatro repetições de cada tratamento) foram amplificadas usando o protocolo Nested PCR descrito em material e métodos. Os fragmentos do gene *nifH* de 320 pb foram então separados por DGGE (Figura 15).

Figura 15- Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante, gerado por separação de fragmentos do gene *nifH* amplificados de amostras de DNA de solo de caatinga, solo de caatinga com 10 anos de plantio de mamona e solo de caatinga com 50 anos de plantio de mamona

Apesar do perfil das repetições de cada tratamento não ter sido idêntico, há presença de bandas características entre as áreas avaliadas. No entanto, deve-se

salientar que trata-se de repetições realizadas em 4 pontos separados em cada tratamento, denominadas de repetições de campo.

A abordagem do DGGE nos estudos microbiológicos permite que as composições de espécies de bactérias amplificáveis revelem questões importantes na dinâmica da comunidade, como a estabilidade das comunidades e as respostas às mudanças sazonais nos principais ambientes estudados (PICENO, et al. 1999).

Com isso, pode-se obter a análise do agrupamento hierárquico, em função da presença e da ausência de bandas que é visualizada em forma de dendrograma (Figura 16).

Figura 16- Agrupamento hierárquico com base na separação por DGGE de fragmentos do gene *nifH* de amostras de solo em áreas de caatinga (CAA), mamona 50 anos (M-50) e mamona 10 anos (M-10). Os números entre parênteses representam repetições de campo de cada área

As amostras tenderam a um agrupamento em função dos tratamentos. O dendrograma indica dois grupos distintos. O primeiro grupo uniu amostras de caatinga com amostras de mamona com 50 anos de plantio. O segundo grupo separou as quatro repetições das amostras de mamona com 10 anos de plantio.

Esta união dos grupos de mamona com 50 anos de plantio com a caatinga mostrada no dendrograma pode ser justificada pela presença de milho consorciado a

cultura mais antiga de mamona diversificando com maior intensidade as espécies de bactérias fixadoras de N neste tipo de solo. Outro fator pode ser a ocorrência do revolvimento do solo para implantação desta cultura há um tempo maior do que na cultura de mamona com 10 anos de cultivo. Nesta última, ocorreram recentes alterações na dinâmica da MOS, uma vez que o revolvimento do solo influencia nas populações de microrganismos (MARCHANT et al. 2002).

As informações sobre a diversidade de microrganismos do solo é escassa em estudos envolvendo a caatinga. Os microrganismos presentes neste solo são fortemente influenciados por fatores físicos e químicos, como umidade do solo, matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, acidez e temperatura (SUBBA, 2001). Em ambientes áridos, a temperatura e umidade são fatores desfavoráveis para o crescimento microbiano no solo e os microrganismos, principalmente bactérias, passam a ser extremamente selecionados (SONNLEITNER 1993). Portanto estes atributos podem justificar o agrupamento hierárquico da floresta nativa da região (caatinga) com os plantios mais antigos de mamona, podendo correlacionar o tempo de cultivo aliado às condições edafoclimáticas com as diferenças encontradas na estrutura da comunidade de diazotrófica.

Em conjunto com o agrupamento hierárquico, foi possível realizar uma análise de escala multidimensional (NMDS) com resultados baseados nos perfis de bandejamento do gene *nifH* após DGGE, de cada área são apresentados na Figura 17.

A NMDS baseia-se na representação gráfica das amostras comparando as distâncias entre elas com as suas respectivas (d_i) similaridades, e avaliando a relação entre essas medidas por meio da regressão linear. A confiabilidade da regressão é dada pelo seu nível de *estresse*. Para o presente trabalho o nível de *estresse* aplicado para bactérias fixadoras de nitrogênio é de 0,13, o que indica que a representação bidimensional é válida, porém não totalmente nítida quanto às separações das áreas, com isso, uma clara separação entre as áreas de caatinga e de mamona com 50 anos de plantio com a área de mamona com 10 anos de plantio pode ser observada como também visto pelo agrupamento hierárquico.

Figura 17- Análise de escala multidimensional (NMDS) dos perfis de fragmentos do gene *nifH* após DGGE, das áreas de caatinga (CAA), mamona com plantio de 10 anos (M-10) e mamona com plantio de 50 anos (M-50). Os números entre parênteses representam repetições dentro de cada tratamento

De acordo com Poly et al. (2001), características físicas e químicas do solo tais como textura, carbono total e o conteúdo de nitrogênio podem ser correlacionadas com as diferenças na estrutura genética dos grupos de genes *nifH*. Tan et al. (2003) também relataram que fatores ambientais como tipo de solo, idade de tratamentos e regime hídrico são fatores determinantes da estrutura da comunidade de diazotróficos.

Complementando a representação gráfica obtida pela NMDS uma ANOSIM foi aplicada com o objetivo de discriminar as áreas, testando as diferenças entre os valores médios de similaridade entre amostras dentro de uma mesma área versus as diferenças entre os valores médios de similaridade entre as áreas avaliadas. Os resultados da ANOSIM mostraram que as três áreas são significativamente diferentes entre si ($R_{\text{global}} = 0,521$; $P < 0,001$), embora a representação gráfica mostra certa similaridade entre a área de caatinga e mamona 50 anos (Tabela 8). Interpretam-se os valores de $R > 0,75$ como indicativos de grupos bem separados; $R > 0,5$ como grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados e $R < 0,25$ como grupos pouco separados, de acordo com o manual do programa Primer5 (CLARKE E GORLEY, 2001).

Tabela 8- Resultado do teste *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de *amplicons* do gene *nifH* de bactérias fixadoras de nitrogênio após DGGE, das áreas de caatinga (CAA), mamona com 10 anos de plantio (M-10) e mamona com 50 anos de plantio (M-50). ($P < 0,05$).

Áreas	Teste <i>Pairwise</i>	Nível de significância (%)
CAA, M-10	0,563	2,9
CAA, M-50	0,396	2,9
M-10, M-50	0,656	2,9

De acordo com o pareamento baseado nos perfis de amplicons do gene *nifH* e na sua distribuição nos solos analisados, pode-se observar que houve variação no perfil da comunidade de bactérias fixadoras de N na caatinga e nos solos dos diferentes anos de cultivo de mamona, demonstrando que cada tratamento possui a sua própria comunidade de bactérias diazotróficas. Contudo, a diferença estatística relatada entre os tratamentos de mamona 10 anos e mamona 50 anos também pode ser explicada por esta última apresentar consórcio com milho, pressupondo-se que esta gramínea contenha diferentes espécies de bactérias, sendo necessário o seqüenciamento dos amplicons separados no gel de DGGE para tais determinações.

Segundo White et al. (1993) nas condições de clima semi-árido, como a alta temperatura, pluviosidade baixa e irregular, presença de vegetação específica, alta salinidade e baixa concentração de matéria orgânica no solo, as populações microbianas são selecionadas e estimuladas sazonalmente de acordo com a estrutura dos nichos ao longo dos anos. Portanto, deve-se considerar que estes fatores influenciam no perfil das comunidades de diazotróficas, indicando uma alta especificidade dos solos da caatinga.

De acordo com Piceno (1999) diferenças relativamente alta nos padrões e perfil de amplicons revelariam alterações nas atividades funcionais da comunidade de bactérias fixadoras, podendo estar ocorrendo algum tipo de desequilíbrio populacional entre os perfis avaliados. Isso poderia estar relacionado ao uso abusivo de fertilizantes nitrogenados, da transformação do solo para introdução de pastos ou até mesmo pela presença de acidez excessiva no solo. De fato, estas condições citadas não podem ser atribuídas aos cultivares de mamona que foram avaliados neste trabalho, pois estão ausentes de quaisquer insumos agrícolas e apresentaram uma faixa neutra de pH.

Todavia, o fator transformação do solo para implantação da cultura de mamona ocorrida há 50 anos pode ser considerado como explicação para diferenciar os solos apenas no padrão hierárquico conforme já mencionado.

Gorlach-Lira e Coutinho (2007), trabalhando com solos com plantio de milho no semi-árido nordestino, encontraram uma grande variedade de espécies de bactérias diazotróficas, exclusivamente bactérias Gram-positivas formadoras de esporos e alguns actinomicetos. Segundo este autor, a versatilidade fisiológica desses grupos de bactérias e a produção de esporos resistentes aos efeitos ambientais permitem que a população sobreviva por grandes períodos de estresse hídrico, altas temperaturas e ao ressecamento, mantendo as populações estáveis ao longo dos anos. Estes fatores podem explicar a presença ativa de diazotróficas no decorrer dos 50 anos de cultivo com mamona, indicando alta especificidade destes microrganismos nestes solos.

A maioria dos trabalhos sobre o estudo de estrutura de comunidade de bactérias diazotróficas no solo relata o potencial de fixação de N atmosférico realizado por simbiose, principalmente pelo gênero *Rhizobium* e, grande parte dos autores inclui em suas pesquisas o isolamento e posterior identificação dos microrganismos envolvidos na fixação biológica do N₂ (FREIRE et al. 2005). Estes estudos sobre FBN em solos do semi-árido nordestino envolvem leguminosas como feijão-caupi, algumas gramíneas como o milho, oleaginosas como algodão, coco, entre outras (HOLANDA, 2004).

Devido à comprovação da FBN através da atividade da nitrogenase e consequente manutenção nos estoques de C e N nos solos de mamona do semi-árido nordestino, abordados de forma pioneira neste trabalho, torna-se necessário a realização de estudos mais aprofundados no bioma caatinga.

Portanto, a utilização desta e outras técnicas moleculares de isolamento, sequenciamento e identificação de bactérias diazotróficas e demais microrganismos abrem novos caminhos para pesquisas inovadoras nestas regiões, podendo promover o aumento na produção agrícola, melhoria nas condições físico-química dos solos e até mesmo a inclusão social dos pequenos agricultores.

5 CONCLUSÕES

Nos solos de caatinga, o aporte constante de matéria orgânica pela vegetação natural condiciona um estoque de C no solo na ordem de 90 Mg ha⁻¹. A mudança de uso do solo para o cultivo da mamona causou uma diminuição de cerca de 50% neste teor, patamar este que permaneceu estável por 50 anos. O nitrogênio total do sistema nativo também foi reduzido na mesma proporção após a introdução da cultura e, da mesma forma, manteve-se constante por 50 anos, mesmo não havendo fertilização química para repor o exportado pelos grãos colhidos. A presença de uma comunidade de bactérias fixadoras de N foi comprovada através da amplificação do gene *nifH* em todas as amostras de solo e sua funcionalidade foi comprovada pela atividade da enzima nitrogenase. Apesar do perfil da comunidade de bactérias fixadoras de N no solo com 50 anos de cultivo de mamona ser similar ao do solo de caatinga, há indícios de que houve alterações e adaptações nesta comunidade ao longo do tempo. Esse fato foi evidenciado pelo agrupamento diferenciado no perfil de bandas do gene *nifH* em cada tratamento analisado.

A biomassa microbiana do solo seguiu a mesma tendência do estoque de C e N, embora o N-microbiano do tratamento de mamona consorciada tenha se mostrado aproximadamente 6 vezes menor do que na mamona sem consórcio (10 anos), indicando uma maior competição pelo N entre a comunidade microbiana e as culturas de milho e de mamona.

O adubo orgânico conhecido como “torta de mamona”, em condições de incubação em laboratório, quando misturado ao solo, aumenta a emissão de CO₂ e N₂O em relação aos solos sem este produto. Aplicado em larga escala, trata-se de um insumo que aumenta a emissão de GEE, embora em quantidades inferiores ao dos demais fertilizantes agrícolas industriais.

Enfim, a escassez de informações sobre o uso do solo na caatinga evidencia a necessidade de novas pesquisas visando o aumento na produtividade agrícola que, por sua vez, irá melhorar a qualidade de vida dos pequenos agricultores locais.

REFERÊNCIAS

AITA, C.; BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; GONÇALVES, C.N.; DA ROS, C.O. Plantas de cobertura de solo como fonte de nitrogênio ao milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, p.157-165, 2001.

ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystem Environmental**, Amsterdam, v.74, p.19-31, 1999.

ANDERSON, J.M., J.S.I. INGRAM. **Tropical soil biology and fertility**: a handbook of methods. Wallingford: CAB Internacional, 171p. 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO-ANP. **Relatório**: biodiesel 2007. Disponível em: [http:// www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp](http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp) Acesso em: 16 out.2009.

ASSIS, C. P; JUCKSCH, I; MENDONÇA, S; NEVES, J. C. L. Carbono e nitrogênio em agregados de latossolo submetido a diferentes sistemas de uso e manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.41, n.10, p. 1541- 1550, 2006.

BERNOUX, M.; ARROUAYS, D.; CERRI, C.C.; BOURENNANE, H. Modelling vertical distribution of carbon in Oxisols of the Western Brazilian Amazon (Rondônia). **Soil Science**, Oxford. v.163, p.941-951, 1998.

BERNOUX, M.; CARVALHO, M. C. S.; VOLKOFF, B.; CERRI, C. C. CO₂ emission from mineral soils following land-cover change in Brazil. **Global Change Biology**, Oxford, v. 7, p. 779-787, 2001.

BERNOUX, M.; CERRI, C. C.; CERRI, C. E. P.; SIQUEIRA NETO, M.; METAY, A.; PERRIN, A. S.; SCOPEL, E.; RAZAFIMBELO, T.; BLAVET, D.; PICCOLO, M. C.; PAVEI, M.; MILNE, E. Cropping systems, carbon sequestration and erosion in Brazil, a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 26, p. 1-8, 2006.

BLAKE, G.R. HARTGE, K.H.; BOWMANN, C.G. Bulk density. In: KLUTE, A.(Ed.). **Methods of soil analysis**. 2 ed.th. Madison: ASA,. p. 363-375, 1986. (Agronomy Monograph , 9).

BOWMANN, A. F. Nitrogen oxides and tropical agriculture. **Nature**, London, v. 392, p 866-867, 1998.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER 6.0**: user manual/tutorial. Plymouth, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Relatório**: Mamona 2009. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/> Acesso em: 16 out. 2009.

COSTA, C. Biocombustíveis x emissões de gases de efeito estufa, **Revista Brasileira do Solo**, Rio de Janeiro, v.35. p.34-56. 2009

DALAL, R. C.; WANG, W.; ROBERTSON, G. P.; PARTON, W. J. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. **Australian Journal Soil Research**, Melbourne, v. 41, p.165-195, 2003.

DALAL, R.C.; HENDERSON, P.A.; GLASBY, J.M. Organic matter and microbial biomass in vertisol after 20 yr of zero tillage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 435-441, 2003.

DEMBA DIALLO, M., WILLEMS, A., VLOEMANS, N., COUSIN, S., VANDEKERCKHOVE, T.T., DE LAJUDIE, P., NEYRA, M., VYVERMAN, W., GILLIS, M., VAN DER GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, p. 400–415, 2004.

DODD, J.C.; BODDINGTON, C.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALES-CHAVES, C.; MANSUR, I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 226, p. 131-151, 2000.

DRURY, C. F.; McKENNEY, D. J.; FINDLAY, W. I. Nitric oxide and nitrous production from soils: water and oxygen effects. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 766-770. 1992.

ELLERT, B.H.; BETTANY, J.R. Calculation of organic matter and nutrients stored in soils under contrasting management regimes. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 75, p. 529-538, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. **Relatório: biocombustíveis**, 2007. Disponível em www.embrapa.br. Acesso em: 10 out. 2009.

FEIGL, B. J.; MELILLO, J.; CERRI, C. C. Changes in the origin and quality of soil organic matter after pasture introduction in Rondônia (Brazil). **Plant Soil**, Ottawa, v. 175, p. 21-29, 1995.

FEIGL, B.J.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M. Balanço de carbono e biomassa microbiana em solos da Amazônia In: MELO I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 423-441, 1998.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A; RIBEIRO, V.Q. (Org.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2005, 519p.

GEE, G.W.; B AUDER, J.W. Particle-size analysis. In: KLUTE, A., ed. Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2.ed th. Madison: **American Society of Agronomy, Soil Science Society of America**, chap 3. p.383-411. 1986 (Agronomy Series, 9).

GOLCHIN, A.; BALDOCK, J.A.; OADES, J.M. **A model linking organic matter decomposition, chemistry, and aggregate dynamics**. New York:Lewis, 1995. 385 p.

GORLACK, K; COUTINHO, H. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.135-141, 2007.

FOLLETT, R.F.; STEWART, B.A. **Soil processes and the carbon cycle**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.245-266.

HARRISON, R.; WEBB, J. A review of the effect of N fertilizer type on gaseous emissions. **Advances in Agronomy**, New York, v.73, p. 65-108. 2001.

HAVLIN, J. L.; KISSEL. A. 1997. Management effects on soil organic carbon and nitrogen in the east-central Great Plains of Kansas. pp. 381-386. In E. A. Paul et al. (Ed.) **Soil organic matter in temperate agroecosystems**. New York: CRC Press,1997.p.134.

HOLANDA, A. Biodiesel e inclusão social. Brasília: **Coordenação de Publicações**, (Série cadernos de altos estudos; n.1). p.13-60, 2004

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Relatório: Consumo e produção de oleaginosas**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 16 out. 2009.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE-IPCC. **Technical summary. Climate change** . Cambridge, 2001. 398p.

_____. **Guidelines for national greenhouse gas inventories** – Agriculture, Forestry and Other Land Use. v.4, Tokio, p.87-134. 2007.

IZQUIERDO J.A.; NUSSLEIN K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 4, p. 441-52, 2006.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. **Soil biochemistry**, Oxford, p.425-471, 1981.

JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology & Biochemistry**, Ohio, v.22 n.8, p.1031-1038, 1990.

KANG, S.; KIM, S.; OH, S.; LEE, D. Predicting spatial and temporal patterns of soil temperature based on topography, surface cover, and air temperature. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.136, n.1-3, p.173-84, 2000.

KELLER M.; KAPLAN, W.A.; WOFSY, S.C.; COSTA, J.M. Emissions of N₂O from tropical forest soil: response to fertilization with NH₄⁺, NO₃⁻ and PO₄⁻³. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 93, p. 1600-1604, 1988.

KIEHL, J.; KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. Nature Reviews. KIEHL, E. J. **Manual de edafologia. Relações solo-planta**. São Paulo: Ceres, 1979. 262 p.

KRAUSE, D.O.; RUSSELL, J.B. How many ruminal bacteria are there? **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1447-1475, 1996.

LAL, R.; KIMBLE, J.M.; LEVINE, E. **Soil management and greenhouse effect**. New York: Lewis, 1995. 385 p.

LAMBAIS, M.R; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; BÜLL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P. DA; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, 2005. v. 4, p. 43-84.

LEAR, B. Application of castor pomace and cropping of castor beans to soil to reduce nematode populations. **Plant Dis. Rep.** Oxford, v.43, n.4, p. 459-460, 1959.

MACDONALD, R. M. Extration of microorganisms from soil. **Biological Agriculture Horticulture**, Bicester, v. 3, n. 4, p. 361-365, 1986.

MAIA, S.M.F; Impactos de sistemas agroflorestais e convencional sobre a qualidade do solo no semi-árido cearense. **Revista da Árvore**, São Paulo, v.30, n..5, p.837-848, 2008.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; RAHMAN, T.J.; BERZANO, M. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. . **Environmental Microbiologic** New York, v.4, p.595-602, 2002.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa- NPMA, 1998. 488 p.

MICHEL, K.; MARITXU, G.; RENÉ, B.J.; REVEL, J.C. Influencia de las substancias húmicas sobre las características bio-físico-químicas de los suelos. Consecuencias sobre la nutrición mineral de las plantas. IN: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, 1996. **Conferências**. Águas de Lindóia, Embrapa, 1996.

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

MOSIER, A.; SCHIMEL, D.; VALENTINE, D.; BRONSON, K. PARTON, W. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. **Nature**, London, v.350 n.28, p. 330-332, 1991.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L. PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NELSON, E.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P.. **Methods of soil analysis**. 2nd ed th. Washington: ASA/SSSA, p.539-579, 1982.

NEVES, CVS, FELLER, C. Matéria orgânica nas frações granulométricas de um latossolo vermelho distroférico sob diferentes sistemas de uso e manejo, Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 17-26, jan./mar. 2005.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento de soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 329-338, 2000.

O'DONNELL, A.G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, I.; DAVIES, J.T. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 135-145, 2001.

OLIVEIRA, J. T.; SANTOS, A. M. S.; MOREAU, A. M.; MENEZES, A. A.; COSTA, O. V. 2008. Características físicas e carbono orgânico de solos sob diferentes tipos de uso da terra. **Revista Brasileira do Solo**, São Paulo, v.32 p.132, 2008.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PANIKOV, N. S. Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 161-176, 1999.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 273p.

PINHEIRO, EFM. **Estoque de carbono e nitrogênio num argissolo amarelo cultivado com cana-de-açúcar: influência da queima ou manutenção da palhada**. Seropédica, Rio de Janeiro, Embrapa Agrobiologia, 2007. 21 p

POLY, F., MONROZIER, L.J., BALLY, R., 2001b. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Revista de Microbiologia**, Viçosa, v.152, p.95–103, 2001.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 1980. 541 p.

RESH, S.C., BINKLEY, D., PARROTA, J.A. Greater soil carbon sequestration under nitrogenfixing trees compared with *Eucalyptus* species. **Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 5, p. 217-231, 2002.

ROSS, A. **Ecological footprint: The journey so far**. WWF – World Wide Fund, Surrey, 2006. 26p.

SCHULTEN, H. R.; LEINWEBER, P. New insights into organic-mineral particles: composition, properties and molecular structure. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 339-432, 2000.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 31p. (Documentos, 134).

SEVERINO, L. S.; MORAES, C. R. A.; GONDIM, T. M. S.; CARDOSO, G. D.; SANTOS, J. W. **Fatores de conversão do peso de cachos e frutos para peso de sementes de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 15p.

SIMONET, P., GROJEAN, M.C., MISRA, A.K., NAZARET, S., COURNOYER, B., NORMAND, P. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p.3278–3286. 1991.

SISTI, C.P.J.; SANTOS, H.P.; KOHHANN, R.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in Southern Brazil. **Soil Till.**, Amsterdam, v.76 p.39-58, 2004.

SILVA, I.F.; MIELNICZUK, J. Ação do sistema radicular de plantas na formação e estabilização de agregados do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, São Paulo. v. 21, p. 113-117, 1997.

SIX, J.; ELLIOT, E. T.; PAUSTIAN, K. Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-till systems. **Soil Science Society of America Journal, Madison**, Oxford. v. 63, p. 1350-1358, 1999.

SONNLEITNER, B. Biotechnology of thermophilic bacteria - growth, products, and application. **Advances and Biochemical and Engineering**, Berlin, v. 28, p. 69-138, 1983.

SUBBA RAO, N.S. **Soil microbiology**. 4. ed. Th. Amsterdam: Science Publishers, 2001.210p.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes of soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.30 p.195-207, 1992.

STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M.; BOWDEN, R.; CASTRO, M.; LUGO, A. The effects of natural and human disturbances on soil nitrogen dynamics and trace gas fluxes in a Puerto Rican wet forest. **Biotropica**, Washington, v. 23, p. 356-363, 1991.

STRECK, C. A.; REINERT, D. J; REICHERT, J. M.; KAISER, D. R. Modificações em propriedades físicas com a compactação do solo causada pelo tráfego induzido de um trator em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p. 755-760, 2004.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Boca Raton, v.19, p.703-107, 1987.

VANCURA, V.; HANZLIKOVÁ, A. Root exudates of plants IV. Differences in chemical composition of seed and seedling exudates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.36, p.271-282, 1972.

VARGAS, L.K. et al. Imobilização de nitrogênio em solo cultivado com milho em sucessão à aveia preta nos sistemas plantio direto e convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.1, p.76-83, 2005.

VICTORIA, R.L; CARDOSO, E.J.B.N. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.105-120. 1992

ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo vegetais**. Curitiba - PR, N.º 717, p. 17-28, 2001.

ZEHR, J.P.; MARCHANT, H.; WILSON, M. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

WHITE, D.; SHARP, R.J.; PRIEST, F.G. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. ***Antonie van Leeuwenhoek***, Amsterdam, v.54, p.357-386, 1993.