### Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

# Diversidade microbiana envolvida na ciclagem do nitrogênio em solos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo

### Júlia Elidia de Lima Perim

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

Piracicaba 2016

#### Júlia Elidia de Lima Perim Bióloga

Diversidade microbiana envolvida na ciclagem do nitrogênio em solos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO DINI ANDREOTE

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

Piracicaba 2016

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

Perim, Júlia Elidia de Lima

Diversidade microbiana envolvida na ciclagem do nitrogênio em solos de cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo / Júlia Elidia de Lima Perim. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016. 125 p. : il.

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

1. Ecologia microbiana 2. Metagenômica 3. 16S DNAr 4. Sequenciamento I. Título

CDD 633.61 P444d

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

Aos meus amados pais e admirável casal Benedito e Ivani, e minha irmã

Giovana,

Dedico.

Às mais belas almas que cruzaram meu caminho: meu marido Adalto e meu

filho João.

Ofereço.

#### AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço à Deus por tudo. Por algum motivo Ele pôs à prova muito do que eu acreditava não conseguir e hoje, ao olhar para trás, encanto-me ao ver as conquistas. Sou imensamente grata ao meu marido Adalto que, da forma como ele pôde, deu força e apoio em todos os momentos durante esse período, além de muita cumplicidade, afeto e um filho, a maior representação divina de amor em nossas vidas. Minha enorme gratidão aos meus pais Ivani e Benedito, minha irmã Giovana, à minha (grande) família e amigos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, meus eternos agradecimentos. Que sorte a minha ter convivido com você nessa jornada! Sou também grata à Universidade de São Paulo e Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela estrutura fornecida em prol do desenvolvimento desta tese. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) o meu agradecimento pelo apoio financeiro concedido no país e fora dele (Processo 2012/03949-9 e 2013/26993-6), além do grande incentivo geral à ciência e desenvolvimento no Estado de São Paulo. Agradeço aos supervisores do trabalho durante meu doc-sandwich em Berkeley, CA, EUA: Dr. Romy Chackaborty, Dr. Janet K. Jansson e ao grupo de pesquisa e corpo técnico do Lawrence LAB. *So many thanks!* 

Agradeço aos colegas que passaram e aos que continuam no time Andreote: Ademir, Agnes, Alessandra, Armando, Bruna, Cristiane, Danice, Daniela, Danielle, Denise, Diogo, Dorotéia, Fábio, Fernandinho, Filipe, Juliana, Kelly, Luana, Lucas, Maria Fernanda, Marina, Maryeimy, Michelle, Mylenne, Pedro, Polé, Simone, Sonia e Thiago. O meu muito obrigada! Obrigada também a Carol Bussoli, Denise Bizuti e Emiliana, grandes amigas que o doutorado me deu. Sem vocês teria sido tudo mais difícil!

A tese representa alguns anos da minha vida moldados por experiências que eu nunca imaginei passar. A ciência e conhecimento engrandece o homem! Meus sinceros agradecimentos à todos que de alguma forma participaram desse engrandecimento pessoal.

"We especially need imagination in science. It is not all mathematics, nor all logic, but it is somewhat beauty and poetry" - Maria Mitchell, astrônoma americana 

## SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Cana-de-açúcar: importância e manejo	17
2.1.2 Microbiota associada ao cultivo de cana-de-açúcar	18
2.1.3 Nitrogênio no solo	23
2.2 Hipótese	26
2.3 Objetivos	26
2.3.1 Objetivo principal	26
2.3.2 Objetivos específicos	26
2.4 Material e Métodos	27
2.4.1 Amostras de solos analisadas	27
2.4.2 Parâmetros físicos e químicos dos solos analisados	28
2.4.3 Extração de DNA	29
2.4.4 Sequenciamento do metagenoma shotgun	29
2.4.5 Extração de DNA para sequenciamento do amplicon do gene 1	6S
DNAr	31
2.4.6 Sequenciamento do <i>amplicon</i> do gene 16S DNAr	33
2.4.7 Quantificação das comunidades microbianas por PCR em tempo r	ear
(QPUR)	34
2.4.8 Estruturação das comunidades microbianas por Terminai Restrict	25
2 5 Desultadas a Discussão	30
2.5 Resultations e Discussão	37
2.5.1 Características físico-químicas e de maneio dos solos	37
2.5.1.1 Características físico-químicas e de manejo dos solos	40
2.5.1.3 Maneios empregados	43
2.5.2 Metagenoma dos solos de cana	44
2.5.2 Metageriena des colos de cana microbiana	44
2.5.2.2 Ocorrência de sequências relacionadas às princip	ais
transformações no nitrogênio no solo	50
2.5.2.2.1 Etapas de transformação	51
2.5.2.3 Grupos microbianos relacionados às principais transformações	do
nitrogênio no solo	56
2.5.2.4 Descrição dos genes codificadores de enzimas relacionadas	s a
transformações do N em solos cultivados com cana-de-açúcar	65
2.5.2.5 Predição da função do metabolismo do N a partir	do
sequenciamento do amplicon do gene ribossomal 16S DNAr por Illum	ina
	68
2.5.3 Quantificação e avaliação da estrutura microbiana participante	do
ciclo do nitrogênio por qPCR e T-RFLP	70
2.5.3.1 Abundância das comunidades microbianas envolvidas no ciclo	do
N	70
2.5.3.2 Estrutura das comunidades amônio-oxidantes nos solos	de
canaviais	75
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

REFERÊNCIAS	
ANEXOS	100

#### RESUMO

# Diversidade microbiana envolvida na ciclagem do nitrogênio em solos de cana-de-açúcar no estado de São Paulo

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo responsável por mais de 50% do total desta produção. Esta cultura tem um enorme impacto sobre a agricultura brasileira e devido a isto, uma melhor compreensão da composição da comunidade microbiana relacionada a ciclagem do nitrogênio (N) nestes solos é de grande importância para o aprimoramento no cultivo da cana-de-açúcar. No entanto, pouco se sabe sobre a relação entre grupos microbianos e essa cultura. Este trabalho visou determinar variações nas comunidades microbianas que participam das transformações do N nos solos de três áreas utilizadas para a produção de cana-de-açúcar (A, F e J), as quais apresentam uma gama de diferentes condições de manejo e características do solo. Cada área foi analisada em triplicatas, e o DNA extraído do solo foi utilizado para metodologias de seguenciamento de segunda geração (metagenômica e sequenciamento do gene 16S rDNA), PCR quantitativo (qPCR) e polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP). A maioria das seguências derivaram de bactérias (98%; base de dados M5NR); seis etapas do ciclo do nitrogênio foram anotadas pela plataforma MG-RAST (base de dados SEED): amonificação do nitrato e nitrito (ANN); fixação de nitrogênio; desnitrificação; óxido nítrico sintase; redução dissimilatória do nitrito e assimilação de amônia. Este último passo mencionado foi o mais abundante (28%) (genes gltb e q/tD) e está diretamente relacionado a multiplicação microbiana nos solos.. O segundo processo mais abundante foi ANN (genes nir e nar), responsável por consumir este substrato durante o ciclo. Proteobacteria, Chloroflexi, Verrucomicrobia e Cyanobacteria estão presentes em todas as etapas do ciclo, representando microrganismos que podem participar das vias de transformação do N e, ademais, foi possível descrever um core microbiano (nível de ordem) representado por Sphingomonadales. Algumas variáveis ambientais, como a aplicação de torta de filtro e a produtividade mostraram uma correlação significativa com a estrutura da comunidade microbiana. Isto também foi encontrado para algumas características do solo como fósforo, magnésio e matéria orgânica. Além disso, identificou-se uma alta abundância de microrganismos carregando genes que codificam enzimas da via de redução do nitrato e nitrito. Portanto, apesar de sua complexidade, o estudo das funcões microbianas de nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar é inovador por acessar de forma conjunta todas as comunidades envolvidas neste ciclo, caracterizadas por sequenciamento, o que evita os problemas inerentes ao cultivo microbiano, além de permitir inferir sobre a hierarquia das variáveis ambientais que influem sobre esse grupos microbianos.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Metagenômica; 16S DNAr; Sequenciamento

#### ABSTRACT

# Microbial diversity involved in the cycling of nitrogen in soil cultivated with sugarcane in São Paulo State

Brazil is the largest world's producer of sugarcane and State of São Paulo accounts for over 50% of this production. This crop has a huge impact on Brazilian agriculture and due to this great importance, a better understanding of the composition of the microbial community related to cycling of nitrogen (N) in these soils is of utmost importance for the improvement in the cultivation of sugarcane. However, little is known about the relationship between microbial groups and this crop. This study aimed to determine changes in microbial communities that participate in the transformation of N in soils derived from three areas used for sugarcane production (named A, F and J), which have a range of different management conditions and soil characteristics. Each area was analyzed in triplicate, and the extracted DNA was used to develop next generation sequencing (shotgun metagenomics and 16S rDNA), quantitative PCR (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Most of the sequences derived from Bacteria (98%; M5NR database); six stages of nitrogen cycle were annotated by MG-RAST plataform (SEED database): nitrate and nitrite ammonification (NNA); nitrogen fixation; denitrification; nitric oxide synthase; dissimilatory nitrite reductase and ammonia assimilation. This last mentioned step was the most abundant (28%) (gltB and gltD genes) and is directly linked to microbial growth in soil, since the final product of the reaction is glutamate. The second most abundant process was NNA (*nir* and *nar* genes), responsible for consuming this substrate during the cycle. Proteobacteria and Chroloflexi are present at all stages of the cycle, representing microorganisms that can participate in the N transformation and, moreover, it was possible to describe a microbial core (at an order level) represented by Sphingomonadales. Some environmental variables, such as the application of filter cake and productivity showed a significant correlation with the structure of the microbial community. This was also found for certain soil characteristics such as phosphorus, magnesium and organic matter. In addition, it was identified a high abundance of microorganisms carrying genes encoding the enzymes for nitrate and nitrite reduction pathway. Therefore, despite its complexity, the study of microbial functions of nitrogen in soils cultivated with sugarcane is innovative by accessing jointly all communities involved in this cycle, characterized by sequencing, which avoids the problems inherent in microbial cultivation and allows to infer about the hierarchy of environmental variables that influence this microbial groups.

Keywords: Microbial ecology; Metagenomics; 16S rDNA; Sequencing

#### 1 INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo produz aproximadamente 56% da cana-deaçúcar no Brasil, que é considerado o maior produtor do mundo. Dentre os mercados crescentes relacionados à produção da cana-de-açúcar no Brasil, destacam-se o etanol, o açúcar, o aproveitamento dos resíduos, e a possibilidade da geração do etanol de segunda geração. Desta forma, a cana-de-açúcar se apresenta como uma cultura altamente rentável, o que torna significativa na discussão de questões sobre o manejo adequado para a alta produtividade da cultura.

Contudo, alguns pontos intrínsecos a esta cultura estão sob constante investigação, como por exemplo, o fato de se observar uma grande variação na produtividade em áreas homogêneas, sob mesmas condições e manejo. Surge então a necessidade de buscar um maior entendimento do sistema solo, cujo ambiente é responsável por abrigar a fertilidade, bem como a ciclagem dos nutrientes essenciais ao desenvolvimento da cana, diminuindo assim o comprometimento da rentabilidade da cultura para o agronegócio devido a possíveis desequilíbrios bióticos e abióticos deste ambiente. Devido a isso, aspectos ainda pouco explorados dentro do sistema de produção de cana-deaçúcar, como por exemplo, a diversidade de comunidades microbianas participantes da ciclagem do nitrogênio, podem responder por estas observações.

Este trabalho visa auxiliar no preenchimento desta lacuna, sendo nele utilizadas amostras de solo de três áreas distintas de cultivo de cana no Estado de São Paulo, analisando características particulares dos solos de cada local, bem como quesitos de manejo adotados pelos agricultores e características químicas e físicas dos solos. Estas variáveis foram correlacionadas com o nitrogênio mineral (nas formas nitrato e amônio) e a diversidade microbiana participante das transformações no N nestes solos. Foi realizada uma abordagem completa por meio da metodologia de metagenômica *shotgun* e sequenciamento de *amplicons* do gene 16S DNAr de bactérias e arqueias, além da determinação da estruturação da comunidade e abundância dos genes marcadores funcionais *nif*H (este

responsável pela codificação da enzima nitrogenase relacionada a etapa da fixação do nitrogênio) e gene *amo*A de bactérias (AOB) e arquéias (AOA) que fazem a oxidação do amônio no ciclo.

Esta abordagem deu origem a um grande montante de dados que levam o projeto a um patamar de alto potencial na geração de conhecimentos sobre o comportamento desses grupos microbianos em solos agrícolas. Portanto, sabendo da importância que tem a ciclagem do nitrogênio no solo num modelo de cultura fundamental no cenário agrícola brasileiro que é a cana-de-açúcar, este trabalho visou identificar como as comunidades microbianas funcionais do ciclo do nitrogênio se comportam perante as diversas variações ambientais e condições de manejo desta cultura, no que diz respeito a estrutura e abundância dos grupos microbianos avaliados a partir de metodologias independentes de cultivo.

#### **2 DESENVOLVIMENTO**

#### 2.1 Revisão Bibliográfica

#### 2.1.1 Cana-de-açúcar: importância e manejo

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente a família Poacea, com metabolismo do tipo C4, e que tem a capacidade de acumular altos níveis de sacarose em seus caules (FERREIRA et al., 2016). As variedades de cana utilizadas comercialmente são resultantes da hibridização Saccharum officinarum e S. interespecífica entre spontaneum (PATERSON et al., 2013). No Brasil, segundo Cheavegatti-Gianotto e colaboradores (2011), o cultivo da cana-de-açúcar está concentrado na região Sudeste, onde os dados atualizados da safra 2015/2016 indicam que esta região é responsável por aproximadamente 65,8% da produção nacional, sendo que o estado de São Paulo contribui com 55,2% da produção brasileira de cana-de-açúcar. As regiões Norte-Nordeste (representa 7,7%) e Centro-Oeste (com 19,7%) são também áreas importantes, onde a cultura avança rapidamente (CONAB, 2016).

O cultivo da cana-de-açúcar é considerado uma das atividades mais rentáveis da economia do Brasil nos últimos anos, destacando o país como o berço mundial da agroenergia com a produção de etanol. Existem mais de 10 milhões de hectares sendo utilizados para esta cultura, considerada a terceira maior em área utilizada para plantio, após o milho e a soja (MARTINELLI e FILOSO, 2008). Na última safra de cana (2015/2016), o Estado de São Paulo destinou 195.666 mil toneladas de cana à produção de etanol (hidratado ou anidro), enquanto que a região Norte-Nordeste destinou 26.656 mil toneladas para esta finalidade (UNICA, 2016). Há a estimativa de que a produção de cana-de-açúcar para a safra de 2016/17 esteja em torno de 690,98 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 3,8% a mais em relação a safra anterior (CONAB, 2016).

A oferta de etanol encontra-se estagnada em razão da ausência de investimentos do setor sucroenergético relacionadas à capacidade produtiva (expansões e *greenfields*) e em produção agrícola de cana-de-

açúcar (REIS et al., 2012). Mesmo assim, o conhecimento disponível relacionado aos impactos da cultura da cana-de-açúcar é escasso, principalmente quando diz respeito aos solos (CORBIÈRE-NICOLLIER, BLANC e ERKMAN, 2011).

Nos últimos anos, aumentos significativos na produtividade de canade-açúcar têm sido atribuídos à adição de fertilizantes nitrogenados (BANDANI et al., 2002, FARONI et al., 2011). O nitrogênio é um dos fatores de crescimento mais importantes das culturas, influenciando na produtividade e na qualidade do produto final (BENDER e VAN DER HEIJDEN, 2015). Assim, a necessidade de se determinar com precisão as recomendações de N é indispensável para o agricultor manter a sua capacidade de produção (BERTOLANI et al., 2007; FARONI et al., 2009). Portanto, este cenário eleva os desafios na busca de uma maior produção com a menor expansão agrícola possível, não comprometendo a rentabilidade da cultura e evitando novos desmatamentos em áreas de fronteiras agrícolas.

#### 2.1.2 Microbiota associada ao cultivo da cana-de-açúcar

O sistema de cultivo da cana-de-açúcar é bastante variável, estabelecido de acordo com as características do terreno, como por exemplo, a eficiência do funcionamento das máquinas sob diferentes condições de declividade. A cana-de-açúcar era tradicionalmente queimada antes da colheita, com a finalidade de remover suas folhas, o que facilitava a colheita manual. No entanto, este processo resultava em elevadas emissões de partículas e fuligem que são prejudiciais aos seres humanos (CANÇADO et al., 2006). A regulamentação atual da produção do bioetanol está levando a uma transição deste sistema para a colheita mecanizada, onde a cana-de-açúcar é colhida inteira (chamada de cana crua) (RACHID et al., 2012). Diversos autores têm relatado os efeitos positivos da colheita da cana crua sobre a fertilidade e a estrutura do solo, como aumentos nos níveis de carbono e na atividade biológica (RESENDE et al., 2006; SILVA et al., 2009). Estes trabalhos, em sua maioria, abordaram aspectos relacionados a microbiota do solo. No

entanto, nenhum deles relaciona a estrutura das comunidades microbianas, descritas baseadas na sua abundância e diversidade, em solos de cultivo de cana-de-açúcar analisados em diversas gestões de manejo e tempo de uso da terra. Apenas recentemente, Gumiere e colaboradores (*in press*) fizeram este tipo de estudo para a comunidade de fungos destes solos. Estes autores mostraram que os fungos exibem um padrão biogeográfico, sendo que a distância geográfica foi o fator que mais explicou a variância na composição da comunidade destes microrganismos (50,75%).

Especificamente em relação ao elemento N, sabe-se que a fertilização nitrogenada na agricultura é caracterizada pela possibilidade de grandes perdas de N aplicado. A pesquisa na área de fertilidade do solo busca formas de minimizar essas perdas, evitando problemas ambientais e prejuízos aos produtores (JORIS et al., 2014). Os baixos valores de eficiência dos fertilizantes nitrogenados usados em canaviais estão associados, entre outros fatores, principalmente com efeitos residuais do fertilizante, bem como sua alta imobilização pelos componentes da fração viva do solo (COURTAILLAC et al., 1998).

A utilização da terra para sistemas agrícolas comumente resulta em modificações das propriedades biológicas, físicas e químicas do solo (SHANGE et al., 2012), o que por sua vez, afeta os ciclos biogeoquímicos, como a transformação de nutrientes e as emissões de gases (ALEF e NANNIPIERI, 1995; ABOIM et al., 2008; VEGA-AVILA et al., 2015). O Brasil é o quinto maior emissor de gases do efeito estufa (GEE) e o maior emissor na América do Sul (HASHIMOTO, 2012), sendo que 75% destes GEE provêm de práticas agrícolas insustentáveis, as quais incluem a exposição do solo à erosão, revolvimento excessivo do solo e da adição de fertilizantes nitrogenados de forma desmedida (PARRY et al., 2007). No que diz respeito à cana-de-açúcar, alguns autores discutem os efeitos da queima e adição de resíduos vegetais no solo sobre a microbiota residente, tendo este manejo papel determinante na emissão de GEE (LA SCALA JUNIOR, BOLONHEZI e PEREIRA, 2006; WALLIS et al., 2010).

Segundo Doran e Parkin (1994), algumas propriedades do solo respondem rapidamente do que outras às mudanças das práticas de

manejo. A atividade e a diversidade microbiana são consideradas potenciais indicadores de degradação do solo, bem como da sua recuperação (LUNDQUIST et al., 1999; CALDERÓN et al., 2001; NANNIPIERI et al., 2003). Grupos microbianos funcionais, tais como os fixadores de nitrogênio e amônio-oxidantes, desempenham papeis fundamentais na ciclagem do nitrogênio em solos agricultáveis (HABTESELASSIE et al., 2013). O estudo destes grupos é muito importante, uma vez que a nitrificação, acoplada com a desnitrificação, constituem as maiores fontes de perda de N no solo (RACHID et al., 2012).

Uma alternativa para se estudar a dinâmica das comunidades microbianas no solo em função às diversas características de cada área é através de uma amostragem detalhada, realizada em diversas parcelas de cultivo num espaço, que podem ser divididas por zoneamento agrícola, que determina quais as regiões dentro do Estado apresentam as melhores condições climáticas para o desenvolvimento de uma cultura (BRUNINI, 2008).

Neste sentido, quando mais variáveis forem as condições de cultivo, bem como as variáveis entre os diferentes talhões dentro de cada área, melhor se torna o desenho experimental para a adequada correlação entre as comunidades microbianas funcionais dos solos e os manejos agrícolas empregados.

Um solo que apresenta alta redundância de funções no ecossistema provavelmente é capaz de manter em equilíbrio os processos ecológicos, mesmo sob um distúrbio. No sistema solo, a redução da diversidade microbiana pode ser um importante indicador da perda de resiliência e, por consequência, da qualidade do solo (PERRY et al., 1989). A abundância de algumas espécies de microrganismos parece não ser tão importante quanto à manutenção da diversidade, isso porque a abundância reflete de forma mais imediata a flutuação das comunidades microbianas no curto prazo enquanto que a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os grupos funcionais no solo (KENNEDY, 1999; LAVELLE, 2000).

A compreensão da distribuição estrutural dos táxons, da abundância microbiana funcional e suas relações com características físicas e químicas do solo, bem como manejo do solo e a cobertura vegetal, são fundamentais para uma visão extensa da ecologia microbiana nos solos (RANJARD et al., 2010). Isto auxiliaria na compreensão de sua funcionalidade no ecossistema, além de uma maior capacidade de minimizar os impactos causados pelo uso da terra e outras atividades humanas.

Devido à grande diversificação das espécies de microrganismos, acredita-se que eles estejam presentes de forma ubígua em todos os habitats terrestres (MARTINY et al., 2006). Dentre estes ambientes, particularmente o solo apresenta-se como um dos mais densamente colonizados por microrganismos, no qual se estima que existam aproximadamente 10<sup>9</sup> células microbianas em um único grama de solo, sendo estas divididas em valores entre 10<sup>4</sup> (ROESCH et al., 2007) e 10<sup>6</sup> (GANS et al., 2005) de espécies bacterianas. Os componentes do solo são em sua maioria microrganismos, que respondem como maior fonte de biodiversidade do planeta, representando, de forma exclusiva, dois dos três domínios da árvore da vida (GARIBALDO, FORTERRE e BROCHIER-ARMANET, 2011); Archaea e Bacteria, além da grande representação de fungos e da fauna dos solo no domínio Eukarya (WOESE et al., 1990). Na mais nova configuração da árvore filogenética (HUG e tal., 2016), o domínio Bacteria é composto por 92 filos, Archaea com 26 filos e Eukarya com 5 supergrupos.

O solo representa um sistema altamente heterogêneo e dinâmico, onde os diferentes componentes das frações sólidas fornecem uma gama de diferentes micro-habitats (VAN ELSAS et al., 2006), promovendo o desenvolvimento e a manutenção de um número extremamente elevado de nichos (TIEDJE et al., 2001; ETTEMA e WARDLE, 2002). Em relação à funcionalidade microbiana nos solos, sabe-se que estes organismos podem apresentar um papel essencial no desenvolvimento e na produtividade das culturas. Formas diretas destas atividades são causadas por relações mutualísticas, onde compostos produzidos pelos microrganismos induzem o desenvolvimento das plantas (THOMSON et al., 2010; MANGAN et al., 2010). No solo, existe uma ampla variedade de fatores ambientais que podem influenciar as estruturas das comunidades de bactérias e arquéias, incluindo pH, salinidade e abundância de carbono (LOGUE e LINDSTROM, 2010; NEMERGUT et al., 2010), dentre outros. No entanto, existem também mecanismos indiretos, onde os microrganismos de vida livre auxiliam o desenvolvimento vegetal promovendo uma maior disponibilidade de nutrientes, efetuando o catabolismo de compostos orgânicos, e produzindo compostos específicos, essenciais para o desenvolvimento dos produtores primários (GRIFFITHS et al., 2006; VAN DER JEIJDEN, BARGETT e VAN STRAALEN, 2008). Portanto, devido a esta importância microbiana para o solo, a compreensão da sua dinâmica neste ambiente é fundamental para predizer as consequências de futuras alterações ambientais (KONOPA, 2006).

Relatos sobre a diversidade microbiana associada à cana-de-açúcar são ainda escassos e normalmente são relacionados a estudos pontuais, realizados em apenas uma área de produção. Esta diversidade já foi descrita em comunidades associadas com a parte aérea das plantas, como endófitos (MENDES e AZEVEDO, 2007; MAGNANI et al., 2010), ou em associação com as raízes, como os microrganismos rizosféricos (LUVIZOTTO et al., 2010). Especificamente nos solos sob cultivo de canade-açúcar, Dini-Andreote e colaboradores (2010) estudaram os efeitos do cultivo de cana-de-açúcar transgênica juntamente com o efeito da aplicação de herbicidas sobre a comunidade bacteriana, constatando a ausência de efeitos destes fatores, mas descrevendo a existência de uma ampla diversidade bacteriana nesses solos, composta principalmente por organismos dos filos Proteobacteria (34,7%), Actinobacteria (28,1%), Firmicutes (16,2%) e Acidobacteria (9,7%). Os autores destacam também a necessidade de estudos mais específicos para compreender quais ambientais são preponderantes na modulação fatores destas comunidades, podendo levar ao desenvolvimento de melhores práticas de manejo.

Portanto, o foco na diversidade microbiana e em seu papel funcional nos solos de cana-de-açúcar é o principal tema desta tese, uma vez que solos brasileiros submetidos à diversas análises integrando muitas variáveis biológicas, físicas e químicas foram pouco investigados em seu sentido amplo, restringindo-se a estudos de análises pontuais tanto na amostragem como nos fatores que envolvem a determinação das comunidades microbianas funcionais. Existe então, a necessidade de acessar de forma mais específica os grupos microbianos representativos de funções metabólicas, como a que aqui é representada pelo metabolismo do nitrogênio, ligando a composição destas comunidades com as variações de tempo de uso da terra, bem como de manejo, entre muitas outras. O intuito final deste tipo de estudo é de inferir sobre a resposta destes grupos frente as variáveis analisadas, tanto alterando suas respectivas abundâncias como as estruturas das comunidades nos solos.

#### 2.1.3 Nitrogênio no solo

Devido ao nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) ser inerte, a disponibilidade deste elemento na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) torna-se um fator essencial para a produtividade primária em ambientes aquáticos e terrestres (FALKOWSKI, FENCHEL e DELONG, 2008). Do ponto de vista biogeoquímico, os microrganismos são considerados essenciais na disponibilização do nitrogênio assimilável pelas plantas, onde atuam na mineralização de compostos orgânicos e na conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (LAM e KUYPERS, 2010; ZEHR e KUDELA, 2011).

O grande *input* de nitrogênio em ecossistemas terrestres provém da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (cerca de 97%) (GALLOWAY et al., 2008), realizada por grupos microbianos pertencentes ao domínio Bacteria e, mais recentemente descrito, em Archaea (STAPLES et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2012). Embora a maioria dos estudos sejam focados na FBN por bactérias em associação com leguminosas, é também importante destacar a entrada deste elemento via fixação por bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL) (CLEVELAND et al., 1999; FUJITA, AOKI e KAWAGUCHI, 2014). A maioria dos microrganismos fixadores é de vida livre e a contribuição deles para a entrada deste nutriente em

ecossistemas tropicais pode variar de 12,2 a 36,1 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (CLEVELAND et al., 1999).

A atividade de conversão do N<sub>2</sub> atmosférico encontrada nestas bactérias pode ser induzida ou estimulada por diversos fatores, como por exemplo pelo aumento da relação C:N das fontes nutricionais do solo, como observado pela exsudação de raízes (BÜRGMANN et al., 2004). Estudos sobre a diversidade de BFNVL, bem como os fatores que influenciam a sua diversidade são de extrema importância para o entendimento do ciclo do nitrogênio nos solos (ZHANG et al., 2006). A grande parte destes estudos utiliza como marcador molecular o gene *nif*H (ZEHR et al., 2003, ZHANG et al., 2006, WAKELIN, 2010), que codifica uma das enzimas fundamentais para o funcionamento do complexo enzimático da nitrogenase.

Dentre as principais etapas do ciclo do nitrogênio, além da FBN estão os processos de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação é dividida em duas etapas, onde o amônio  $(NH_4^+)$  é convertido primeiramente em nitrito  $(NO_2^-)$  e posteriormente em nitrato  $(NO_3^-)$ . O gene *amo*A, um dos responsáveis pela codificação da enzima amônio monoxigenase, que participa do primeiro passo da oxidação da amônia, tem sido extensivamente usado como marcador molecular em estudos independentes de cultivo envolvendo bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e arquéias oxidadoras de amônio (AOA) (CARNEY, MATSON e BOHANNAN., 2004; LEININGER et al., 2006; SINTES et al., 2012). Características funcionais de AOB e AOA têm sido analisadas correlacionando a abundância de genes *amo*A com taxas de nitrificação em solos e sedimentos (JIA e CONRAD, 2009; MERTENS et al., 2009).

Já o processo de desnitrificação dá-se pela redução do nitrato, que corresponde à transformação em nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), e eventualmente em nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>). A habilidade de reduzir o nitrato é encontrada em vários grupos filogenéticos (ZUMFT, 1997; PHILIPPOT, 2002), sendo cada passo composto por um complexo enzimático codificado por vários genes, os quais possibilitam a caracterização e quantificação de grupos de microrganismos envolvidos na desnitrificação (PETERSEN et al., 2012). Segundo Philippot, Hallin e

Schloter (2007), a desnitrificação pode ser definida como um processo respiratório microbiano que utiliza os óxidos de nitrogênio solúveis como receptor de elétrons alternativo quando o oxigênio não está disponível para a respiração aeróbica.

Ocorre ainda dentro das transformações no nitrogênio no solo, a redução dissimilatória do nitrito. As enzimas nitrito redutases são codificadas pelos genes nirK (Cu-Nir) e nirS (Cd-Nir) que, diferentemente dos nitrificantes, microrganismos desnitrificantes são filogeneticamente mais distribuídos e diversos no solo (ZUMFT, 1997; SALLES e POLY, 2012). O nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) é o substrato para a produção de óxido nítrico (NO), a qual antecede a etapa realizada pela óxido nítrico sintase, que converte o NO a óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) (PAL, KRARDENAVIS e PUROHIT, 2015). Além destas sub-etapas dentro do processo de desnitrificação, ocorre também a amonificação do nitrato (genes nar, nap e nrf) e nitrito (gene nir). Na primeira reação, enzimas nitrato redutases convertem o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e a segunda reação corresponde a transformação do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em amônio (NH<sub>4</sub>OH) pelas nitrito redutases. Estes genes estão presentes em diversos filos bacterianos, incluindo Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroides e Firmicutes (MOHAN et al., 2004). Este processo é conhecido também como redução dissimilatória do nitrato a amônio (DNRA) e tem sua grande contribuição em diversos ambientes, conservando o N em forma de amônio, que pode ser assimilado por plantas e microrganismos, ou oxidado a nitrato novamente (DONG et al., 2009; GIBLIN et al., 2013).

Além de todas estas sub-etapas da desnitrificação, o processo de assimilação da amônia pelos microrganismos no solo é realizado por um conjunto de reações enzimáticas do metabolismo e que são codificados pelo gene *glt*, mais especificamente o *glt*B e *glt*D, que corresponde a maior e menor subunidade da enzima, aos quais são responsáveis pela transformação da amônia em glutamina e glutamato, respectivamente (SUZUKI e KNAFF, 2005). Este processo é a via principal de incorporação da amônia nos sistemas biológicos, dando origem ao nitrogênio orgânico utilizado nas mais diversas reações celulares.

Esta grande gama de modificações indica claramente a importância das funcionalidades microbianas para a adequada ciclagem do nitrogênio nos solos. Sabe-se que estas transformações são afetadas por fatores ambientais como, por exemplo, temperatura, disponibilidade de oxigênio, pH, fornecimento de matéria orgânica e compostos inorgânicos (WALLENSTEIN et al., 2006). Neste enfoque, utilizando de metodologias de sequenciamento de segunda geração, esta tese buscou responder algumas das lacunas existentes dentro deste contexto da ecologia microbiana em solos de canaviais brasileiros.

#### 2.2 Hipótese

A hipótese proposta para esta tese é a de que a comunidade microbiana funcional participante do ciclo do nitrogênio responde, modificando sua abundância e estrutura de comunidade, segundo alterações nas características do solo e dos manejos adotados para o cultivo de cana-de-açúcar.

#### 2.3 Objetivos

#### 2.3.1 Objetivo principal

O objetivo geral desta tese foi descrever as variações nas comunidades microbianas que participam das transformações do nitrogênio, em solos cultivados com cana-de-açúcar.

#### 2.3.2 Objetivos específicos

De forma mais detalhada, buscou-se nesta tese:

 Determinar a composição (abundância e estrutura) das comunidades microbianas participantes do ciclo do nitrogênio nas amostras de solos, por meio do sequenciamento do DNA (metagenoma *shotgun* e *amplicon* do gene ribossomal 16S rDNA), T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) e qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) em três áreas de cultivo de cana-de-açúcar, realizados em solos distintos e sob diferentes manejos;

 Inferir, com base em análise multivariada e de bioinformática, os principais parâmetros ecológicos que determinam a composição taxonômica e funcional dos grupos que desempenham as etapas do ciclo do nitrogênio nestes solos.

#### 2.4 Material e Métodos

#### 2.4.1 Amostras de solos analisadas

As amostras de solo utilizadas neste estudo foram obtidas de três locais de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo no ano de 2011, denominadas áreas A, F e J, no intuito de preservar sua localização e propriedade, conforme combinado com os proprietários durante as coletas (Figura 1).



Figura 1 – Figura do Estado de São Paulo, a região de amostragem; Imagens (Google Earth) de todas as áreas de coleta que compõe o projeto de pesquisa ao qual esta tese está vinculada (A, B, D, F, G, I, J, K e L) (i); Estado de São Paulo com as três regiões de cultivo de cana selecionadas para o desenvolvimento desta tese (destacadas em vermelho) (ii)

As áreas de trabalho fazem parte de uma coleção maior de amostras de solo coletadas em nove regiões produtoras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, utilizadas em outros estudos do grupo de pesquisa. Cada uma destas áreas foi amostrada em seus diversos talhões, com preferência para a diversificação das práticas de manejo entre os mesmos. Cada talhão amostrado foi representado por duas repetições de aproximadamente 500 g de solo, coletados na entre-linha das plantas com auxílio de trado holandês, na camada de 0 a 20 cm do solo (Anexo A e C).

Dentre estas amostras, a seleção das áreas A, F e J foi baseada nas características mais contrastantes existentes entre os parâmetros considerados variáveis ambientais deste trabalho, como tempo de cultivo de cana (TCC) e uso de fertilizantes, por exemplo.

#### 2.4.2 Parâmetros físicos e químicos dos solos analisados

As amostras de solo foram submetidas a determinações de suas características físicas e químicas. As análises químicas foram compostas das determinações de valor de pH (em solução de CaCl<sub>2</sub>); quantidades de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez potencial (H+AI), soma de bases (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) em valores de mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; saturação por bases (V) em porcentagem; matéria orgânica (MO) em g dm<sup>-3</sup>, além das quantificações de nitrogênio nas formas de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amônio) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato) dadas em mg N/kg solo (determinadas médias de duas repetições) (Anexo B). As características físicas foram limitadas a granulometria, quantificando as frações de areia, silte e argila determinadas em porcentagem (Tabela 1; Anexo A). Estas quantificações foram terceirizadas junto ao Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP, com exceção das extrações de amônio e nitrato, realizadas de acordo com o protocolo de Keeney e Nelson (1982).

Cada área de canavial foi também caracterizada segundo o tempo de cultivo de cana (TCC) medido em anos; aplicação de fertilizante mineral (FM), vinhaça (Vin), torta de filtro (TF), carvão ativado (CA), colheita mecanizada (CM) e queima da cana (QC), descritos como presente ou ausente; produtividade da cultura (Produt) em valores de t/ha e temperatura do solo (T) em graus Celsius (°C) (Anexo C). Estes características foram obtidas por meio de entrevistas realizadas diretamente com o produtor e/ou responsável da usina sucroalcooleira.

Os dados físicos e químicos dos solos e atributos de entrevista foram submetidos ao teste de comparação de médias Tukey (p<0,05) no *software* Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009) (Tabela 1).

#### 2.4.3 Extração de DNA

Para as análises de qPCR, T-RFLP e metagenoma por *shotgun*, o DNA foi extraído utilizando o kit *PowerSoil*® *DNA Isolation Kit* seguindo as instruções do fabricante. Apenas pra a análise de metagenômica houve

uma modificação no primeiro passo de extração, na qual foi usado 2 g de solo em vez de 0,25 g.

Para observar a integridade do DNA, alíquotas de 5  $\mu$ I foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 0,5× (Tris-acetato-EDTA) (20 mM Tris, 10 mM acetato, 0,5 mM EDTA; pH 8,0) e corado em solução de brometo de etídio. Como padrão molecular, foi utilizado 235 ng (2  $\mu$ I) de *Lowmass DNA Ladder* (Invitrogen Technology) e posteriormente o gel foi submetido a um campo eletroforético de 80 V por aproximadamente 30 minutos. A aquisição da imagem foi realizada utilizando-se o densitômetro *Storm*<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

#### 2.4.4 Sequenciamento do metagenoma shotgun

Nove bibliotecas metagenômicas de sequenciamento *shotgun* foram preparadas representando triplicatas das três áreas estudadas (Anexo D). Para tanto, o DNA contido nas amostras de solo foi extraído como descrito no item 2.4.3 e utilizados para preparo das bibliotecas de sequenciamento usando o kit *Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Kit* (Illumina, Inc.). O sequenciamento foi realizado utilizando a tecnologia *HiSeq 2500* no modo de execução rápida. Este procedimento ocorreu no *Vincent J. Coates Genomics Sequencing Laboratory for California Institute for Quantitative Biosciences* (*QB3*), localizado na Universidade da Califórnia, em Berkeley, CA, EUA. As nove amostras foram multiplexadas numa linha da placa de sequenciamento, resultando em valores entre 3,4 e 4,2 Gb de dados por amostra, com tamanho médio de sequências de aproximadamente 150 pb.

As sequências geradas, alocadas em arquivos FASTQ, foram anotados pela plataforma *Metagenomics Rapid Annotation* (MG-RAST) versão 3.3.6 (MEYER et al., 2008). As informações detalhadas e com os números de acesso as mesmas no banco de dados estão descritos no Anexo E.

Para as análises *downstream*, foram utilizados apenas os *datasets* R1, uma vez que não foi possível fazer a união das sequências obtidas nos arquivos R1 e R2. Estas sequências deram origem aos perfis taxonômicos e funcionais, sendo esta informação utilizada sempre na forma normalizada, a qual foi gerada através da abundância dos grupos encontrados (taxonômicos ou funcionais) com o número total de sequências de cada uma das amostras. A afiliação das sequências foi realizada comparando as mesmas com as sequências disponíveis nos bancos de dados M5NR e SEED (*Subsystems*), com valores de alinhamento mínimo de 15 pb e *E*-value *cut-off* de *E*<1x10<sup>-5</sup> (FIERER et al., 2012). Com isto, uma tabela de frequência de *reads* para cada táxon (taxonomia) ou subsistema (função) em cada um dos metagenomas foi gerada.

Para verificar as diferenças estatísticas na ocorrência de grupos taxonômicos ou funcionais entre as áreas de cana, bem como avaliar os grupos que compõe o *core* microbiano, o programa *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) foi utilizado (PARKS e BEIKO, 2010). Para isso, a tabela de frequência de sequências (taxonomia e função) de cada metagenoma foi utilizada como *input* ao programa. Valores de *p* foram calculados utilizando o teste *two sided Fischer's exact* (FISCHER, 1958) corrigidos por Benjamin-Hochberg FDR (BENJAMIN e HOCHBERG, 1995). Para plotar as abundâncias dos táxons classificados de cada etapa do ciclo do nitrogênio, além dos solubilizadores de P e os gráficos de bolhas, foi utilizado o *software* Tableau<sup>®</sup>.

A tabela de dados também foi utilizada na análise de componentes principais (PCA) e análise de redundância (RDA), ambas visando a exploração de múltiplos grupos de dados. Nas PCAs foram utilizados os perfis taxonômicos e funcionais (STAMP), assim como nas RDAs, onde estes perfis foram correlacionados com as características ambientais dos solos. A validação das correlações encontradas na RDA foi determinada pelo teste de permutação de Monte Carlo, aplicado com 1.000 permutações. As análises, bem como os gráficos foram gerados utilizando o programa Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, Holanda) (TER BRAAK e SMILAUER, 1998).

Os índices de alfa diversidade foram calculados a partir da matriz de riqueza utilizando o índice de Shannon utilizando o *software* PAST (HAMMER et al., 2001).

# 2.4.5 Extração de DNA para sequenciamento do *amplicon* do gene 16S DNAr

Visando maior eficiência, uniformidade e rapidez nas extrações do DNA das amostras, esta etapa foi desenvolvida no laboratório sob responsabilidade da pesquisadora Dr. Janet Jansson, departamento localizado na *Earth Sciences Division (ESD)* do *Lawrence Berkeley National Laboratory*. Neste local existe um processo automatizado de extração de DNA a partir de amostras de solo, onde a plataforma robótica *epMotion*® *5075 Vac* da Eppendorf é acoplada a utilização do kit *PowerSoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratory*, EUA).

Neste processo, um cotonete de algodão estéril foi introduzido em cada tubo de Eppendorf de 1,5 mL contendo a amostra de solo e, após a remoção, o esfregaço (algodão + solo) foi inserido na placa para iniciar o processo de extração do DNA. Cerca de 750 ul de Bead Solution, seguido de 60 µl de solução de C1 foi adicionado a cada poço. A placa dos grânulos foi selada e colocada num banho-maria a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, a placa foi posta presa de forma segura no agitador de placas 96 Well Plate Shaker durante 20 minutos, seguido por centrifugação durante 30 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi transferido para uma placa limpa, que foi coberta com fita selante e incubada a 4°C durante 10 minutos, seguido por centrifugação a 2500 x g durante 10 minutos. Cerca de 600 µl de sobrenadante foram transferidos para uma placa limpa, seguido por centrifugação durante 10 minutos a 2500 x g. Em seguida, 200 ul de solução de C3 foi adicionada a cada poço da placa, incubadas a 4°C, durante 10 minutos, seguido por centrifugação a 2500 x g durante 10 minutos. Cerca de 700 µl de sobrenadante foram transferidos para uma placa limpa e centrifugado a 2500 x g durante 10 minutos. Em seguida, cerca de 650 µl de sobrenadante foram transferidos para uma placa limpa, seguido de uma adição da solução de C4 e misturado. A placa com 650 µL de sobrenadante + 650 µL de solução C4 foi coberto com a fita selante e armazenados em 4°C, na geladeira (overnight).

Após este passo, a 650 µl de solução de C4 foi adicionado a cada poço da placa e misturado. Em seguida, 650 µl foram transferidos da placa para a *Spin Plate* e aplicou-se vácuo durante 3 minutos por 2 vezes. O vácuo final levou 5 minutos. Este processo ocorreu até que o volume inteiro tenha sido transferido e, em seguida, 500 µl de solução C5 foram adicionados a cada poço da *Spin Plate* e aplicado vácuo durante 5 minutos, seguido de selagem da placa e centrifugação. Em seguida, esta placa foi encaixada numa outra placa limpa e livre de resíduos (*0,5 mL Collection Plate*) e centrifugada para remover qualquer C5 residual durante 10 minutos a 2500 x g. A *Collection Plate* foi encaixada numa *Microplate* previamente identificada. Após este processo, 100 µl de solução C6 foram adicionados a cada poço na *Microplate* e centrifugada a 2500 x g durante 10 minutos e, em seguida, protegida pela película de vedação e armazenada a -20°C até seu processamento.

Este protocolo foi utilizado de forma a permitir a inserção destas amostras no projeto denominado *Earth Microbiome Project* (*EMP*) (GILBERT, JANSSON e KNIGHT, 2014), liderado por uma equipe da qual faz parte a Dr. Janet Jansson, e onde estas amostras contam como umas das poucas obtidas de solos utilizados para a agricultura.

#### 2.4.6 Sequenciamento do amplicon do gene 16 DNAr

O gene 16S DNAr foi amplificado em reações em cadeia da polimerase (PCRs) usando os iniciadores F515/R806, sendo este conjunto de iniciadores capazes de acessar grupos de bactérias e arqueias, tendo como alvo a região V4 do gene 16S DNAr (CAPORASO et al., 2012). As reações de PCR continham 2,5 ul de tampão de PCR Taq Takara Ex, 2 ul Takara dNTP mix, 0,7 ul Roche albumina de soro bovino (BSA) (20 mg mL<sup>-1</sup>), 0,5 ul de cada iniciador (10 uM de concentração final), 0,125 ul Takara Ex Taq DNA polimerase *Hot Start* (Takara, Shiga, Japão), 1,0 ul de DNA genômico (5 ng por reação) e água livre de nucleases num volume final de 25 ul. As reações foram realizadas a 94 °C durante 3 minutos para desnaturar o DNA, seguido de amplificação durante 35 ciclos a 94 °C durante 45 s, 50 °C durante 1 min e 72 °C durante 90 s; uma extensão

final de 10 min a 72 °C foi adicionado para assegurar a amplificação completa.

Cada amostra foi trabalhada em triplicata, combinadas e purificadas utilizando o sistema de purificação de PCR *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Os fragmentos purificados foram quantificados usando o ensaio *Qubit dsDNA HS* e o tamanho dos produtos de amplificação foi determinado usando *Bioanalyzer* com *Agilent DNA 1000 chips* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). *Amplicons* foram agrupados (25 ng por amostra) e sequenciados em uma linha da placa na plataforma *Illumina HiSeq 2000* (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA), resultando em sequências de aproximadamente 100 pb. O sequenciamento foi realizado junto ao *Biofrontiers Institute*, um laboratório colaborador do *EMP* em Boulder, Colorado. Este procedimento foi realizado seguindo todo o protocolo do *EMP*.

Os processos de *de-multiplexing*, controle de qualidade e geração de Unidades Operacionais Taxonômicas (UTOs) foram feitas no *software* Qiime (CAPORASO et al., 2010). As sequências de baixa qualidade foram removidas do total de *reads* obtidos segundo os seguintes parâmetros: Q20; *minimum number of consecutive high-quality base calls* = 100 bp; valor máximo de N permitido = 0; *maximum number of consecutive low-quality base calls allowed before truncating a read* = 3. Após estes processos, os *reads* restantes foram usados para gerar as UTOs e posteriormente sequências representativas de cada UTO foram comparadas com as disponíveis no banco de dados *GreenGenes*, que automaticamente identifica ao valor de 97% de identidade, resultando em dados compatíveis com investigações filogenéticas de comunidades microbianas baseadas em análises de reconstrução de funções (PICRUSt 1.0.0) (http://picrust.github.com/picrust/).

A predição de funções relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, por sua vez, foi determinada pelo *pipeline* previamente proposto pelo *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUSt) (LANGILLE et al., 2013).
### 2.4.7 Quantificação das comunidades microbianas por PCR em tempo real (qPCR)

Para quantificar os números de cópias dos genes alvo por grama de solo das amostras, o DNA foi submetido à técnica de qPCR. As reações foram realizadas em duplicata no equipamento *Rotor Gene 6000* (Corbett Life Science, Austrália) e o sistema de detecção utilizado foi *Sybr Green I*. Todas as reações foram feitas em volume de 10 µl contendo 5 µl do kit *Platinum*® *Quantitative PCR SuperMix-UDG kit* (Invitrogen, Brasil) e 0,1 µM dos oligonucleotídeos.

Para as amplificações do gene *nif*H foram utilizados os *primers* FGPH19 e PoIR (Anexo P), e a ciclagem foi a 5 minutos a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 45 segundos a 57 °C, 1 minuto a 72 °C. Para as amplificações do gene *amo*A de arquéias (AOA) foram utilizados os *primers* 196F e 277R; para o gene *amo*A de bactérias (AOB) foram amoA1F e amoA2R (Anexo F). Os ciclos ocorreram numa amplificação com desnaturação inicial de 3 minutos a 95 °C, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C; 30 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C para AOA; já para AOB a desnaturação inicial foi de 5 minutos a 94 °C, seguidos de 45 ciclos de 45 ciclos de 15 ciclos de 1 minuto a 94 °C; 1 minuto a 60 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C.

Em todas as quantificações, curvas padrões foram obtidas por meio de amplificações com o número de cópias conhecido do DNA molde adicionado nas reações. Com isto, foi possível determinar a eficiência da quantificação, bem como o valor de regressão logarítmica das diluições utilizadas ( $R^2$ ). A especificidade das amplificações foi determinada por meio de curvas de desnaturação, realizadas com variação de temperatura de 60 a 96 °C e com a avaliação dos produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose. Com os sistemas válidos, os valores de *ct* (*cycle threshold*) obtidos para cada amostra em cada uma das reações foram utilizados para a quantificação absoluta dos genes de interesse nos solos analisados. Os métodos estatísticos utilizados para avaliar a abundância dos genes foram o teste de comparação de médias Tukey (p<0,05) para verificar a diferença entre as médias dos tratamentos e

análises de regressão linear, as quais verificam um fator condicional em função de uma variável.

## 2.4.8 Estruturação das comunidades microbianas por *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)

A escolha da metodologia de T-RFLP se deu devido à quantidade de amostras a serem comparadas, o que torna inviável o uso de outras técnicas, como o PCR-DGGE, na qual se aceita a comparação entre amostras num mesmo gel de eletroforese. Portanto, a técnica independente de cultivo T-RFLP mostrou-se a melhor alternativa a ser empregada.

As amplificações foram realizadas segundo a literatura com os primers descritos no Anexo P, utilizando sempre o iniciador forward marcado com a fluorescência FAM na extremidade 5'. Fragmentos de 635 pares de base (pb) foram gerados para o grupo microbiano de AOA e 491 pb para AOB. Posteriormente, as amostras foram purificadas em placas de 96 poços, utilizando 50 µl do produto da amplificação com o fluoróforo mais adição de 200 µl de isopropanol, seguido de incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Subsegüente a isto, foi feita uma centrifugação a 4500 rpm por 90 minutos, descartando o sobrenadante e dando um spin com a placa invertida. Após este processo, foi adicionado 250 µl de etanol absoluto e repetido o processo de centrifugação anterior. Em seguida, a placa foi submetida a secagem em superfície estéril e a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. O produto final foi ressuspendido em 50 µl de água estéril e quantificado em gel de agarose 1,5% com obtenção da imagem pelo densitômetro Storm<sup>™</sup> (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Todos estes procedimentos foram realizados protegendo as placas da luminosidade.

As amostras então foram clivadas com as respectivas enzimas (Anexo P). Foram utilizadas quantidades de aproximadamente 200 ng de produto de amplificação com 5 unidades de enzima (ANGEL et al., 2010), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para se obter réplicas do equipamento, cada amostra foi lida duas vezes em seqüenciador

automático *ABI Prism 3500* (Applied Biosystems), utilizando-se a matriz azul e o marcador molecular de 600 pb.

A análise dos eletroferogramas obtidos foi feita no *software* GeneMapper 4.1 considerando os parâmetros 'alelos', 'tamanho de pico', 'altura de pico' e 'área do pico', ajustados ao padrão GS600LIZ. Conforme diferenciação dos grupos a nível de 0,5 pb, foram geradas matrizes de 508 picos para o grupos das arquéias amônio-oxidantes e 224 picos para as bactérias amônio-oxidantes, sendo estas utilizadas para as análises estatísticas. As matrizes de área do pico geradas pelo programa GeneMapper 4.1 foram analisadas pelo *software* PAST 2.14 (HAMMER et al., 2001) e Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, Holanda) (TER BRAAK e SMILAUER, 1998).

Os métodos estatísticos utilizados para analisar as comunidades foram a análise das coordenadas principais (PCoA) utilizando a matriz de similaridade Bray-Curtis, que verifica a ocorrência de agrupamentos semelhantes com relação à composição microbiana; análise de similaridade (ANOSIM) também foi utilizada para estimar a diferença estatística da estrutura das comunidades microbianas funcionais, buscando confirmar se os agrupamentos estabelecidos são ou não distintos. Nela, resultados de R<0,5 indicam que os grupos pré-estabelecidos são semelhantes; 0,5<R<0,75 indicam grupos distintos, porém com alguma semelhança; e R>0,75 indicam grupos totalmente diferentes. Além destas análises, foi feita a análise de redundância (RDA), que permite estabelecer as diferenças entre os pontos amostrais, como também correlacioná-las com as outras variáveis ambientais.

### 2.5 Resultados e Discussão

#### 2.5.1 Caracterização das áreas de estudo

As amostras de solo das três áreas de estudo deste projeto foram submetidas às análises para caracterizações físicas e químicas, sendo assim possível inferir sobre as diferenças nas texturas e na fertilidade destes solos. As regiões escolhidas para serem avaliadas foram determinadas segundo as características mais diferentes entre elas, como a variação na produtividade e no tempo de cultivo de cana (TCC). Isto foi possível devido às informações obtidas por entrevista aos funcionários e produtores das áreas de coleta.

#### 2.5.1.1 Características físicas, químicas e de manejo dos solos

As características químicas do solo, bem como as físicas, são consideradas relevantes à determinação da estrutura e diversidade das comunidades microbianas (FAORO et al., 2010). Portanto, a determinação destes quesitos nos solos das áreas foi de grande importância para esta tese e essenciais para as respostas à hipótese. Em geral, os valores de pH obtidos foram semelhantes entre as três áreas (Tukey, *p*>0,05), variando entre 5,3 e 5,4, sendo estes valores os comumente encontrados em áreas de cultivo com a cultura da cana-de-açúcar (CERRI e MAGALHÃES, 2012). O macronutriente P e a saturação por bases (V) também apresentaram valores similares estatisticamente, enquanto que quantificações de outros nutrientes, como K, Ca e Mg diferiram entre os solos das diferentes áreas (Tabela 1), sendo encontrados em maiores quantidades nos solos de cana da Área A. As principais características das três diferentes áreas são:

- Área A. Solos com altas concentrações de cálcio (46,0 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e magnésio (16,4 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), maiores do que os das outras áreas, bem como a soma de bases (70,0 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), capacidade de troca catiônica (105,7 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e matéria orgânica (29,7 g.dm<sup>-3</sup>). A análise física das amostras mostrou que os solos são os mais argilosos (65%) e com maiores valores de silte (14%) (Tukey, *p*<0,05) (Tabela 1).</li>
- Área F. Seus solos caracterizaram-se de forma intermediária em relação aos demais, porém com poucas diferenças estatísticas entre estes e os oriundos das duas outras áreas.

A exceção ocorre para a concentração do amônio, encontrado em teores menores (9,3 mg.kg<sup>-1</sup>) nesta área. Além disso, os solos da Área F possuem aproximadamente 53% de areia e 37% de argila, quantidades também intermediárias entres os solos da Área A e J (Tukey, p<0,05) (Tabela 1).

— Área J. Nestes solos os valores foram menores dos macronutrientes cálcio (29,4 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e magnésio (7,4 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), além da acidez potencial (17,8 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), soma de bases 39,9 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e capacidade de troca catiônica (57,7 mmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>). Os solos são os mais pobres em matéria orgânica (17,6 g.dm<sup>-3</sup>) e mais ricos em nitrato (18,9 mg.kg<sup>-1</sup>). A caracterização física do solo desta área apresentou valores maiores de areia (74%) e menores de argila (22%) e silte (3%) (Tukey, *p*<0,05) (Tabela 1).</p>

Estas caracterizações evidenciam o gradiente das condições ambientais utilizado neste estudo. Este gradiente deve ser útil na busca por possíveis diferenciações que ocorrem nas comunidades microbianas quando o ambiente se altera de maneira gradual. Desenhos experimentais similares foram utilizados em outros estudos, onde gradientes de desenvolvimento do ambiente (DINI-ANDREOTE et al., 2016) ou gradientes de contaminação de solos (ANDREOTE et al., 2012) mostraram-se úteis neste tipo de descrição de resposta das comunidades microbianas do solo.

Tabela 1 – Valores médios dos dados químicos, físicos e atributos de entrevista dos solos amostrados

Variável		Area A	Area F	Area J
<sup>ns</sup> pH	CaCl <sub>2</sub>	5,3±0,04 a	5,4±0,07 a	5,4±0,1 a

		-		
<sup>ns</sup> P	mg dm⁻³	40,7±14,4 a	33,0±3,6 a	23,0±5,3 a
*K		7,5±1,7 a	4,9±0,5 ab	3,1±0,7 a
*Ca		46,0±4,5 a	35,5±3,3 ab	29,4±3,7 b
**Mg	mmol dm <sup>-3</sup>	16,4±1,0 a	11,8±1,0 b	7,45±0,8 c
**H+AI	mmoi <sub>c</sub> am	35,75±1,3 a	32,1±1,8 a	17,8±1,2 b
**SB		70,0±6,9 a	52,3±4,6 ab	39,9±4,8 b
**CTC		105,77±7,3 a	84,31±5,3 b	57,71±4,2 c
<sup>ns</sup> V	%	64,7±2,4 a	59,8±2,9 a	67,1±3,7 a
**MO	g dm⁻³	29,7±5,7 a	23,4±1,4 b	17,6±1,5 c
*N-NO3 <sup>-</sup>	ma ka <sup>-1</sup>	16,2±1,7 ab	14,1±0,6 b	18,9±1,0 a
**N-NH4 <sup>+</sup>	тід ку	13,7±0,5 a	9,3±0,4 b	12,9±0,5 a
**Areia		20,8±6,3 c	53,5±4,3 b	74,2±1,1 a
**Silte	%	14,0±1,7 a	8,6±1,0 b	3,38±0,2 c
**Argila		65,2±4,7 a	37,9±3,3 b	22,5±1,1 c
**TCC	Ano	9,3±0,7 b	26±4,0 a	7,3±0,7 b
<sup>ns</sup> Produtividade	Toneladas/ano	93,1±8,1 a	84±4,6 ab	72,5±3,43 b
**T	°C	23,4±1,0 b	29,4±1,4 a	29,1±1,0 a

Valores indicam a média das dez repetições seguidos pelo  $\pm$ erro padrão; médias seguidas pela mesma letra (ab) não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05)

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

P – fósforo; K – potássio; Ca – cálcio; Mg – magnésio; H+Al – acidez potencial; SB – soma de bases; CTC – capacidade de troca catiônica; V – saturação por bases; MO – matéria orgânica; NO<sub>3</sub> – nitrato; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – amônio; TCC – Tempo de Cultivo de Cana; T – Temperatura

As três áreas de cultivo de cana possuem valores diferentes estatisticamente de matéria orgânica, sendo a Área A a que contém mais MO e a Área J a que contém menos. A MO em solos nativos é fortemente descrita na literatura como a maior fonte e reserva de nitrogênio para as plantas (GHALEY, HØGH-JENSEN e CHRISTIANSEN, 2010; OTTO et al., 2014). Sabe-se, portanto, que a mineralização deste material orgânico tem contribuição na nutrição vegetal, seja este papel exercido em sua plenitude em áreas naturais, ou em taxas variáveis, em solos agrícolas. Segundo Vieira-Megda e colaboradores (2015), na cultura da cana a avaliação da exigência de nitrogênio é difícil de ser medida, pois a disponibilidade do N orgânico é expressiva, mesmo que variável de acordo com as mudanças nos teores de umidade e temperatura, bem como a escolha das práticas de manejo utilizadas por cada produtor.

Na literatura, até o desenvolvimento deste trabalho, não foram encontrados estudos realizadas de maneira conjunta em diferentes áreas de cultivo, que foque nas transformações do nitrogênio nos solos agrícolas, e que correlacione as comunidades associadas estas transformações com o numero de variáveis utilizadas neste trabalho..

#### 2.5.1.2 Nitrato e amônio em solos de cana

Dentre todas as comunidades microbianas presentes nos solos, o enfoque principal deste trabalho foi avaliar aquelas que participam da ciclagem no nitrogênio. Portanto, foi feita a quantificação do N mineral presente nas amostras do solo em suas duas formas; o amônio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e o nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ambos elementos possuem uma grande importância ecológica, pois sua presença no solo indica a ação dos microrganismos responsáveis por cada transformação do nitrogênio, como também pode indicar, em culturas agrícolas, a presença do fertilizante mineral aplicado (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Na solução do solo, a predominância do íon N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em relação ao N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é observada geralmente em ambientes com baixos valores de pH, baixas temperaturas e alta umidade (DJIK e ECK, 1995), fatores estes que inibem o processo de nitrificação (STARK e HART, 1997). A disponibilidade, bem como a localização e formas de N que são encontradas no perfil do solo podem variar em decorrência das alterações nas taxas de amonificação, nitrificação e desnitrificação (MILLER e CRAMER, 2004). Em geral, as taxas de nitrificação e desnitrificação são regidas por fatores que interferem diretamente na atividade microbiana, como pH, temperatura, aeração e umidade do solo (LEWIS, 1986).

Foi verificado que a área com ausência de adubação mineral (Área F) possui quantidades menores de amônio e nitrato em seus solos, enquanto que nas outras áreas os valores são maiores para ambos os íons (Figura 2, Anexo B). Nota-se, portanto, que a adubação pode ter provido maiores quantidades de nitrogênio nestes solos, enquanto que áreas sem adubação nitrogenada, a concentração dos íons amônio e nitrato foram menores. Segundo Vitti e colaboradores (2007), o maior

desenvolvimento das raízes da cana pode favorecer a produtividade da cultura através do acúmulo de nutrientes na região da rizosfera, sugerindo uma resposta positiva direta à adubação nitrogenada. Uma observação interessante é de que a produtividade de cana Área F tem valores próximos aos da Área A, indicando que não apenas a disponibilidade do N mineral sustenta esta afirmação.



Figura 2 – Concentração de amônio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dos pontos de cada área estudada. As barras representam valores da média de três repetições com o desvio padrão

As concentrações de nitrato  $(N-NO_3^-)$  foram maiores em todos os pontos amostrados dos canaviais (Figura 2), o que é esperado, uma vez que o amônio  $(N-NH_4^-)$  sofre rápida conversão para o nitrato, quando atinge o solo em condições de aerobiose, por meio do processo de nitrificação (BARRET et al., 2016).

No que diz respeito ao íon nitrato, em solos agrícolas, este é normalmente encontrado em concentrações maiores que amônio e, com relação à fisiologia de plantas, existe um consenso geral de que muitas espécies são capazes de assimilar, armazenar e metabolizar melhor o nitrato como sua principal fonte de N (MOORE e BOTHA, 2013). Quando há excessiva absorção de nitrato pela planta, ocorre seu acúmulo dentro dela, uma vez que o nitrato não é reduzido à formas orgânicas antes de ser reduzido a amônio (DWYER, 1995). Entretanto, o entendimento sobre o uso de fontes de N pela planta é complexo, pois existe a

heterogeneidade dos processos que envolvem solo-microrganismo-raiz. Ainda deve ser melhor explorado o fato deste íons poderem ser utilizados pela microbiota do solo na síntese de formas orgânicas de N (como por exemplo, aminoácidos e peptídeos), as quais podem ser disponibilizadas para a nutrição das plantas, possivelmente cumprindo papel mais importante do que as atribuídas a estas atualmente (NÄSHOLM et al., 2009).

Em cana-de-acúcar, há muita discussão em torno do assunto e existem indícios de que ela prefira absorver o amônio ao invés do nitrato (PARASHAR et al., 1980; ARMAS et al., 1992). No trabalho de Robinson e colaboradores (2011), cultivares híbridos comerciais (Saccharum spontaneum e Saccharum officinarums) absorveram maiores quantidades de amônio quando os foram fornecidas fontes de nitrato e amônio. Neste mesmo trabalho, os resultados do comportamento de Saccharum ssp. não foram similares aos das outras plantas pertencentes a família Poaceae. As gramíneas sorgo e milho absorveram quantidades iguais de nitrato e amônio; já Erianthus preferiu nitrato a amônio. Seguindo a mesma ideia, Ishikawa e colaboradores (2009) observaram em campo que Erianthus e sorgo absorveram 30 vezes mais nitrato em seus caules em relação aos valores absorvidos pela cana-de-açúcar. Já o trabalho de Vinall (2011) mostrou que quando três fontes de nitrogênio (amônio, nitrato e glicina) são fornecidas simultaneamente às raízes de cana-de-açúcar em campo, a maior absorção é de nitrato, seguido de glicina e amônio. Portanto, notase a variação de preferência dos íons nitrato e amônio pela cana e por plantas em geral, possivelmente sendo as diferenças atribuídas as variações genotípicas das plantas, e as condições ambientais.

### 2.5.1.3 Manejos empregados

As áreas de estudo deste trabalho apresentam distintas estratégias de manejo do solo (Anexo C). No que diz respeito à fertilização mineral dos solos das áreas, na entrevista com os produtores foi informado a presença ou ausência de aplicação de fertilizantes na cultura, sem informações de dosagem e/ou tipo utilizado, sendo a Área F a única com

ausência de fertilização mineral (Anexo C). Segundo Kibblewhite e colaboradores (2008), o manejo convencional que utiliza o fertilizante nitrogenado inorgânico tende a ter seu custo mais elevado a cada safra e, além disso, é conhecido por apresentar efeitos negativos sobre o meio ambiente. Quanto a outras fontes de nutrientes a cultura, as Áreas A e F receberam aplicação de torta de filtro, resíduo da indústria sucroalcooleira, sendo este aplicado como fonte de nitrogênio, fósforo e cálcio para a cana-de-açúcar (ADORNA, CRUSCIOL e ROSSATO, 2013).

Na Área A, além da aplicação da torta de filtro, alguns dos talhões foram fertilizados com vinhaça (Anexo C), resíduo gerado da produção do etanol, que causa diversos efeitos sob o solo e sua microbiota (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Segundo Gianchini e Ferraz (2009), a utilização da vinhaça em culturas agrícolas, especialmente em cana-de-açúcar, fornece benefícios à planta. Um dos principais deles é a atuação como fonte de potássio (SILVA et al., 2014), podendo atuar diretamente na produção de colmos e na altura das plantas (OTTO et al., 2010). Alguns talhões da Área A receberam aplicações de carvão ativado, elemento com funções de adsorção à diversas substâncias, tais como metais pesados (LYUBCHIK et al., 2004) (Anexo C). Machida e colaboradores (2004) trabalharam com carvão ativado granular e mostraram que ele foi capaz de adsorver o chumbo, evitando assim o acúmulo deste metal pesado no solo e diminuindo a toxidez às plantas.

No que diz respeito à utilização de máquinas nos canaviais, a mudança do sistema de colheita de cana a partir do processo de queima por meios mecânicos no Brasil é um processo irreversível, sustentado pela legislação referente ao setor sucroalcooleiro (VIEIRA-MEGDA et al., 2015). No entanto, o cenário mostra também que a cultura da cana é uma das mais afetadas pela compactação do solo, uma vez que 60% das raízes fasciculadas localizam-se na camada de 20 a 30 cm de profundidade (DE LIMA, DE LEÓN e DA SILVA, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). As áreas de cana deste trabalho diferem entre si neste quesito (Tukey, p<0,05), sendo que apenas a Área F foi descrita como tendo alguns talhões aonde é feita a colheita manual da cana, realizada posteriormente à queima da palhada (Anexo C). Quanto à utilização do

sistema de queima da cana-de-açúcar, as três áreas possuem talhões que usam e não usam este tipo de manejo. No sistema de produção desta planta, a queima das folhas e colmos têm sido uma prática comum para facilitar a colheita (GALDOS et al., 2009).

Contudo, não foram encontrados relatos na literatura quanto à avaliação da estruturação das comunidades envolvidas no processo de ciclagem do nitrogênio em canaviais e como elas se comportam perante aos efeitos de manejo acima mencionados.

#### 2.5.2 Metagenoma dos solos de cana

O sequenciamento metagenômico (*shotgun*) gerou um total de 450 milhões de sequências de 150 pb (R1 e R2) distribuídos em 9 *datasets*, com uma média de 50 milhões de sequências por amostra. Deste total de sequências, 21 milhões (4,6%) não passaram pelo controle de qualidade do *pipeline* do MG-RAST (Anexo D e E). Como o número de fragmentos pareados na tentativa de unir as sequências R1 e R2 foi pequeno, os resultados apresentados foram determinados segundo conjunto de dados R1, totalizando pouco mais de 213 milhões de sequências após o controle de qualidade.

### 2.5.2.1 Descrição da comunidade microbiana

A composição taxonômica das comunidades foi avaliada utilizando a anotação filogenética dos reads metagenômicos (Figura 3). O domínio Bacteria foi o grupo numericamente predominante na composição das comunidades microbianas todas as áreas de estudo. em Aproximadamente 98% de todo o conjunto de dados foram taxonomicamente atribuídos às bactérias, adicionados de alguns representantes do domínio Archaea (1%) e Eukarya (1%). O filo bacteriano encontrado em maior abundância nos solos foi Proteobacteria (44%), seguido por Actinobacteria (26%) e Acidobacteria (6%). Estes resultados corroboram outros já descritos na literatura, onde Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria são frequentemente encontrados em maior abundância em solos tropicais (MIYASHITA, 2015; LIMA-PERIM et al., 2016; ŽIFČÁKOVÁ et al., 2016) e agrícolas (FIERER et al., 2012b; RAMPELOTTO et al., 2013).

No total, foram detectados 27 filos dentro do domínio Bacteria (Figura 3B), sendo que dentro do filo mais abundante – Proteobacteria – foram identificadas 6 classes, com destaque para a maior abundância relativa de Alphaproteobacteria (Anexo F).

Quanto às arqueias, houve representação de 33% do total de sequências deste domínio afiliadas ao filo Euryarchaeota, constatado como o mais abundante nestes solos. Este filo já é descrito como o mais numeroso em outros biomas, como águas termais (MARDANOV et al., 2011) e sedimentos marinhos (BESAURY et al., 2014). As classes deste filo foram afiliadas a nove grupos distribuídos entre todas as áreas e a maior abundância delas foi encontrada em solos da Área J. Dentre as classes, 37% é representado por Methanomicrobia, seguido de Halobacteria (25%), Thermococci (10%), Methanobacteriales (6%), Methanococci (6%), não-classificados (6%), Archaeoglobi (5%). Thermoplasmata (3%) e Methanopyri (2%). O segundo filo mais abundante foi Thaumarchaeota com 28% dos reads afiliados, seguidos por Crenarchaeota (20%). Outros filos como Korarchaeota e Nanoarchaeota representaram juntos aproximadamente 8%.

Nota-se pelas PCAs (Figura 3A) dos perfis taxonômicos que não houve uma nítida separação entre a estruturação da comunidade microbiana das três áreas a este nível de classificação. Porém, uma observação interessante foi a de que a tendência ao agrupamento existe a níveis de classificação mais refinados (ordem e família), com uma porcentagem alta de explicação dos eixos (93,1 e 81,1%, respectivamente) (Figura 3A).



Figura 3 – Afiliação taxonômica dos reads metagenômicos. A figura mostra o resultado dos datasets completos submetidos à análise do banco de dados do M5NR utilizando o software MG-RAST v3.5. PCA baseada em múltiplos grupos (níveis de filo a família), aplicando o teste de ANOVA, Tukey-Kramer como post-hoc test para confiança dos dados corrigido por Benjamini-Hochberg FDR utilizando o software STAMP (A); abundância de sequências dos filos microbianos por área de canavial utilizando o software Tableau; o diâmetro da circunferência equivale ao valor da abundância relativa de cada filo classificado (B).

De maneira a complementar a avalição feita com base na taxonomia, os valores de diversidade foram também estimados. Valores de alfa diversidade (*Shannon H'*) foram similares entre as áreas. A Área A teve o maior valor (1,84), ao passo que a Área F o menor (1,80). Verifica-se que a alfa diversidade em solos de cana é menor quando comparados a valores encontrados por Navarrete e colaboradores (2013), que trabalharam com amostras de solos de floresta e pastagem, uma vez que existe a tendência à diminuição dos valores de diversidade microbiana em solos de monocultura (FIGUEROLA et al., 2014; ZHAO et al., 2015).

Para visualizar as diferenças na estrutura da comunidade entre as áreas de estudo, matrizes de abundância dos perfis taxonômicos foram submetidas a uma Análise de Redundância (RDA), correlacionando a estrutura das comunidades com variáveis físicas, químicas e de manejo das áreas, a qual apresentou 98,2% de explicação total dos dados (Figura 4).



Figura 4 – RDA comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade microbiana. Todas as variáveis ambientais foram utilizadas para gerar o gráfico, porém as identificadas com \* foram as significantes (p<0,05) utilizando o teste de permutação de Monte Carlo. Foram utilizados valores de abundância relativa baseados no banco de dados M5NR a nível de classe. P = fósforo

Os perfis metagenômicos apresentaram uma discreta separação entre as áreas de cana, principalmente separando a Área J das demais no primeiro eixo, enquanto que as áreas A e F tendem a se separar no eixo y. Foram verificados quais dos fatores ambientais se correlacionam de forma mais íntima com os perfis microbianos obtidos através dos valores de  $\lambda$ A (%). A variável ambiental que apresentou significância estatística quando correlacionada aos perfis taxonômicos da comunidade microbiana foi a aplicação de torta de filtro, relacionada ao eixo que aparece explicando 47% da variação dos dados (*p*<0,03). Em seguida, vem o elemento fósforo como o segundo fator ambiental estatisticamente significante (*p*<0,04), relacionado ao eixo y, onde 17% da explicação da variação total dos dados é plotada (Figura 4).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), no ano de 2013 a cana-de-açúcar foi considerada uma cultura que forneceu altas quantidades de biomassa anuais. No que diz respeito à torta de filtro, que é um resíduo de extrema importância em diferentes aspectos, além de ser descrito como um material sólido composto de água, partículas inorgânicas, açúcares e pequenos pedaços de bagaço da cana (JANKE et al., 2016), é comumente aplicado como fertilizante orgânico nos canaviais, onde é descrito por servir como fonte de N, P e K para as plantas, aumentando a porcentagem de germinação, além da melhoria dos teores de matéria orgânica, carbono orgânico, nitrogênio total e fósforo disponíveis no solo (ELSAYED et al., 2008). No entanto, sua participação na alteração das comunidades microbianas do solo é ainda incipiente. Os dados aqui obtidos indicam este papel da torta de filtro, sendo que esta pode atuar tanto na adição de microrganismos no solo, como no estímulo da atividade microbiana de grupos já presentes neste sistema. Dentro destas duas possibilidades, este estudo verificou que esta variável se sobrepôs a todas as demais para se correlacionar a estruturação diferencial das comunidades microbianas presentes nos solos analisados.

A partir do conhecimento das bactérias solubilizadoras de fósforo e sua atuação sobre o crescimento das plantas, foi feito o levantamento da abundância relativa destes gêneros nos solos de cana (Figura 5). A importância desta informação no contexto da tese refere-se ao metabolismo do N e do P serem complementares (MARKLEIN et al., 2016) e podem atuar de forma a integrar as transformações dos elementos, ajudando no equilíbrio biogeoquímico nos solos.

Foi observado que os grupos descritos como solubilizadores de P estão presentes em maior abundância nas parcelas que receberam aplicação de torta de filtro (37%) e menor abundância nos solos das áreas A e J (30 e 33%), corroborando as inferências apresentadas pela RDA (Figura 3). Microrganismos responsáveis pela conversão do fósforo a formas assimiláveis pelas plantas pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* (HARIPRASAD e NIRANJANA, 2009) e são estudadas no

50

âmbito da promoção de crescimento das plantas em solos com alta concentração de fitato (KUMAR et al., 2013).



Figura 5 – Afiliação taxonômica dos reads metagenômicos aos gêneros descritos como solubilizadores de P em solos cultivados com canade-açúcar. A figura mostra a abundância relativa encontrada nos datasets completos submetidos à análise do banco de dados do M5NR utilizando o software MG-RAST v3.5 nas três áreas de estudo

Contudo, a literatura é abundante na indicação de que o fator ambiental que mais determina a distribuição e a estrutura das comunidades microbianas em solos é o pH (ROUSK et al., 2010; MERON et al., 2012; SHEN et al., 2013). No presente estudo, outros fatores podem ter surgido a frente deste, devido a similaridade entre os valores de pH das diferentes áreas utilizadas neste tese.

Uma abordagem metagenômica em solos, utilizada por Fierer e colaboradores (2012a), sugeriu que o prévio conhecimento dos diferentes táxons presentes numa comunidade microbiana é de extrema importância quando se quer predizer a diversidade funcional microbiana num ambiente. Dessa forma, o conjunto de dados desta tese é bem robusto e não foi explorado em sua totalidade, de maneira a concentrar esforços no principal foco do trabalho, que está na descrição dos perfis funcionais que participam da ciclagem do nitrogênio nestes solos.

# 2.5.2.2 Ocorrência de sequências relacionadas às principais transformações no nitrogênio no solo

Dados metagenômicos permitem a busca por funções específicas dentro do complexo metabolismo microbiano, além de detectar

populações que estão presentes em baixa quantidade no ambiente (CAPORASO et al., 2012). A fim de caracterizar quais organismos e quais processos do ciclo do nitrogênio estão presentes em maior abundância nestes solos nas diferentes áreas, foram selecionadas as sequências afiliadas a cada etapa separada do ciclo e esquematizada junto às diversas reações químicas de transformação do nitrogênio no solo (Figura 6).

Nota-se que a abundância das sequências afiliadas aos processos, quando comparadas entre as três áreas de estudo, mostraram-se similares entre as áreas A e F e distintas na Área J, a qual possui a menor abundância delas. Em relação a proporcionalidade de sequências afiliadas a cada etapa de transformação do nitrogênio, uma maior similaridade foi verificada entre as áreas de estudo. A maioria dos genes marcadores detectados nas transformações do nitrogênio codificam para enzimas que atuam na assimilação do amônio (28%) e nos processos da amonificação do nitrato e nitrito (DNRA) (21%) (Figura 6; Tabela 2). Esta mesma condição foi observada por Llorens-Marès e colaboradores (2015), que trabalharam com amostras de lagos euxínicos da Espanha.



Figura 6 – Abundância e distribuição das sequências das etapas do ciclo do nitrogênio. A abundância das sequências em cada dataset está indicada por diferentes cores. Dados dos perfis funcionais obtidos pelo MG-RAST; Subsystem level 3 (SEED database).

A utilização do banco de dados SEED *Subsystems* fornece informações sobre ação enzimática, bem como mecanismos regulatórios do metabolismo. As anotações das sequências equivalem aos grupos que possuem os genes particulares de cada via, ou seja, a via da desnitrificação descrita nesta tese é representada por microrganismos que possuem os genes de todos os processos de transformação do N na desnitrificação. Já a via de redução dissimilatória do nitrito, por exemplo, diz respeito aos grupos que possuem apenas os genes deste passo (*nir*), identificando os microrganismos que realizam esta reação dentro da via da desnitrificação.

#### 2.5.2.2.1 Etapas de transformação

O processo mais abundante nas áreas, a assimilação do amônia  $(NH_3^+ \rightarrow microrganismos)$  refere-se ao mecanismo principal de regulação da amônia já conhecido em bactérias e arqueias (REITZER, 2003; MURO-PASTOR, REYES e FLORENCIO, 2005), na qual a assimilação deste íon constitui numa via metabólica central de assimilação do nitrogênio na maioria dos microrganismos (LEIGH e DODSWORTH, 2007). Juntamente com a enzima glutamato sintase, estes sistemas desempenham a primeira função da incorporação da amônia a biomassa, transformando-a em glutamina e glutamato, codificadas pelos genes gltB e gltD (maior e menor subunidade da enzima) (SUZUKI e KNAFF, 2005). A assimilação da amônia se correlacionou negativamente com a concentração de nitrato nos solos de cana (p<0,006; r=-0,82), ou seja, as duas variáveis movemse em direções opostas, indicando que na ocorrência deste processo (geração da glutamina e posteriormente glutamato), ocorre uma menor disponibilidade deste íon para ser transformado em nitrato (SHI et al., 2014).

Metagenoma	Assimilação da amônia	Desnitrificação	Redução dissimilatória do nitrito	Amonificação do nitrato e nitrito (DNRA)	Óxido nítrico sintase	Fixação ( nitrogên
A1	0,50	0,24	0,30	0,39	0,29	0,12
A2	0,50	0,25	0,32	0,39	0,30	0,10
A3	0,51	0,21	0,31	0,40	0,32	0,10
Ę	0,53	0,22	0,31	0,41	0,32	0,09
F2	0,53	0,24	0,34	0,42	0,34	0,11
F3	0,53	0,22	0,34	0,41	0,34	0,10
J1	0,24	0,11	0,01	0,19	0,15	0,05
J2	0,12	0,05	0,08	0,10	0,08	0,02
J3	0,50	0,21	0,31	0,37	0,31	0,11

Tabela 2 – Valores normalizados da abundância de sequências afiliadas às funções de cada etapa do ciclo do nitrogênio (SEED database; nível 3); valores apresentados por metagenoma

O segundo processo mais abundante de transformação do N nos solos foi DNRA (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NH<sub>4</sub>OH), que pode ser realizado por bactérias e fungos (STEIN e KLOTZ, 2016). Primeiramente, o nitrato é convertido a nitrito pela enzima nitrato redutase e que, posteriormente, é convertido a amônio pela nitrito redutase (PAL, KRARDENAVIS e PUROHIT, 2015). Os genes responsáveis pela codificação das proteínas da etapa da amonificação do nitrato são *nrf*, *nar* e *nap* (nitrato redutase), mais especificamente *nrf*A (enzima citocromo C), *nar*G (enzima ligada à membrana) e *nap*A (enzima periplasmática) (ROUSSEL-DELIF et al, 2005). Já a amonificação do nitrito corresponde aos genes *nir* (nitrito redutase); um deles é o *nir*S (citocromo cd<sub>1</sub> – Cd-Nir) e o outro o gene *nir*K (enzima ligada ao cobre – Cu-Nir), sendo que os microrganismos podem possuir combinações destes genes, tendo apenas um de cada ou ambos em seu genoma (SALLES, LE ROUX e POLY, 2012).

Portanto, o consumo do nitrato neste processo corrobora com a correlação negativa encontrada entre as variáveis DNRA e nitrato (p<0,004; r=-0,83), uma vez que havendo gasto de nitrato dentro do sistema, entendese que ambas variáveis caminham em direções opostas, tendo em vista a não-geração de nitrato na via, mas sim o seu consumo e manutenção de N no sistema pela geração de amônio (LU, ZHANG e SHI, 2013).

As vias de redução dissimilatória do nitrito  $(NO_2^- \rightarrow NO)$  e a via de óxido nítrico sintase  $(NO \rightarrow N_2O)$  vêm em seguida na enumeração dos processos mais abundantes. As sequências afiliadas a estas funções foram similares nos valores de abundância relativa. A primeira via em questão diz respeito a apenas as sequências afiliadas ao gene *nir*, ou seja, a microrganismos que possuem apenas este gene em seu genoma, diferentemente do que foi descrito no processo de amonificação do nitrato e nitrito (*nar, nap* e *nir*). Muitos estudos têm descrito o gene da nitrito redutase como marcador genético para a diversidade de bactérias desnitrificadoras (HALLIN e LINDGREN, 1999; BRAKER, FESEFELDT e WITZEL, 1998), mas em 2001, Casciotti e Ward identificaram *nir*K em bactérias oxidadoras de amônia, levando a crer que os microrganismos que possuem esse gene participam de ambos os processos dentro do sistema do ciclo do N. Adicionalmente, após a ação da enzima nitrito redutase sobre o nitrito, este substrato serve a via de óxido nítrico sintase, sendo ele convertido em óxido nítrico (NO) e, posteriormente, a enzima óxido nítrico redutase converte o NO em óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), que finalmente é transformado em N gasoso (N<sub>2</sub>) pela enzima óxido nitroso redutase na via da desnitrificação (PAL, KRARDENAVIS e PUROHIT, 2015). Portanto, a abundância similar de ambos os processos nas áreas pode ocorrer pela complementariedade destes processos no sistema e pela ação sequencial das enzimas citadas anteriormente.

Sustentado pela comunidade bacteriana, a etapa da desnitrificação  $(NO_3^- \rightarrow N_2)$  é o passo responsável pela remoção do nitrogênio do sistema, devolvendo o elemento à atmosfera na forma de  $N_2$  (STEIN e KLOTZ, 2016). Nos solos utilizados para o cultivo da cana-de-açúcar, a abundância relativa das sequências afiliadas aos genes da desnitrificação foi baixa (maior apenas que o processo de fixação do N2), corroborando resultados relatados por Jansson e Taş (2014). Estes autores encontraram este mesmo padrão em metagenomas de permafrost do Ártico. Durante este processo, ocorre a catalisação sucessiva da molécula N, formando NO, N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>, sendo este último o estágio menos oxidado do elemento (LIGI et al., 2014). A princípio, o nitrito é formado a partir da atuação de uma enzima nitrato redutase, seguido pela redução dele a NO pela mesma enzima, e depois reduzido a N2O pela enzima óxido nítrico redutase. Finalmente, o N2O é reduzido a N2 por um complexo enzimático composto por óxido nitroso redutases (gene nosZ), localizado no periplasma de bactérias desnitrificantes gram-negativas (PHILIPPOT et al, 2007). Além disso, condições de baixa disponibilidade de oxigênio são necessárias para que ocorra este processo.

Hofstra e Bouwman (2005) mostraram que o tipo da cultura, aplicação de fertilizantes nitrogenados, bem como o tipo destes foram os fatores mais significantes que podem levar a alterações nas taxas de desnitrificação no solo. Nossos dados mostram que a variável produtividade correlacionou-se positivamente com a abundância deste processo nas áreas de cana (p<0,03; r=0,71). Acredita-se, portanto, que um conjunto de fatores possa favorecer esta correlação positiva, como a fertilidade do solo e o método de manejo adotado, pois este processo está ligado diretamente a quantidade de carbono

disponível para os microrganismos (SENBAYRAM et al., 2009; SENBAYRAM et al., 2012), uma vez que foi observada uma menor abundância das sequências relacionadas a desnitrificação na Área J, que possui os solos menos férteis quando comparados aos outros. Possivelmente, a estrutura dos solos auxiliem nesta explicação, uma vez que maiores produtividades são esperadas de cultivos conduzidos em solos argilosos, onde também predomina a condição de menor disponibilidade de O<sub>2</sub>, essencial para a ocorrência da desnitrificação.

Por fim, a etapa do ciclo do nitrogênio que apresentou menor abundância nos solos analisados foi a fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN). A FBN é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase, uma metaloproteína, codificada pelos genes contidos no operon nif (HOWARD e RESS, 1996), sendo o gene nifH marcador molecular desta etapa (ZEHR et al., 2003; MAN-AHARONOVICH et al., 2007). Esta etapa, em termos ecológico e econômico, é a mais importante dentro das transformações do nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Sabe-se que grande parte dos microrganismos diazotróficos são associativos e endofíticos obrigatórios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; GABY e BUCKLEY, 2011) e têm como nicho preferível as regiões rizosféricas (SHU et al, 2012; BERTHRONG et al., 2014). Em canade-acúcar, Herbaspirillum spp. e Gluconacetobacter diazotrophicus foram descritas por Junior e colaboradores (2000) como bactérias endofíticas capazes de realizar a FBN. Para esta tese, a coleta das amostras do solo foi feita na entre-linha da cana-de-açúcar, evitando proximidade das raízes, a fim de excluir o efeito rizosférico do sistema e, com isso, microrganismos de vida livre fixadores de N<sub>2</sub> podem estar em menor abundância no bulk soil, correspondendo assim ao menor valor encontrado para estes grupos.

### 2.5.2.3 Grupos microbianos relacionados às principais transformações do nitrogênio no solo

Com a finalidade de saber quais filos de microrganismos estão associados aos processos do metabolismo do nitrogênio, foram selecionadas as sequências que se afiliaram às diferentes etapas do ciclo e, em seguida, foi feita a atribuição taxonômica de cada uma destas (Figura 7). Com a avaliação dos perfis taxonômicos dos processos de transformação do nitrogênio individualmente foi possível chegar a informações mais sólidas sobre a diferenciação das comunidades microbianas entre as áreas estudadas, como por exemplo visando apenas as bactérias da FBN, ou apenas os grupos desnitrificantes.

Seis etapas da transformação do N nos solos foram analisadas (Figura 6). Estas foram plotadas de forma conjunta (Figura 7A e 7B), de forma a propiciar uma melhor visualização dos processos deste ciclo. Com algumas exceções, como as sequências encontradas afiliadas aos grupos *unassigned*, *unclassified* (*derived from Bacteria*) e *unclassified* (*derived from other sequences*), foram detectados 21 filos bacterianos, envolvidos em algum ponto no processo de metabolismo do nitrogênio no solo.



Figura 7 – Afiliação taxonômica dos reads metagenômicos dos grupos microbianos associados ao metabolismo do nitrogênio. A figura mostra o resultado dos datasets completos submetidos à análise da base de dados SEED (subsystem nível 3) vs M5NR utilizando o software MG-RAST v3.5. O ciclo do nitrogênio no solo foi esquematizado por etapas de transformação do elemento (1 a 6); modificado de Levy-Booth et al., 2014 (A). (1) Fixação do nitrogênio; (2) Assimilação de amônia; (3) Desnitrificação; (4) Redução dissimilatória de nitrito; (5) Amonificação do nitrato e nitrito (DNRA); (6) Síntese de óxido nítrico (B). HMSON – N orgânico de alto peso molecular; DON – N orgânico dissolvido; ANR – redução assimilatória do nitrato

A etapa 1 representa o processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>, onde foram encontradas sequências classificados em 12 filos bacterianos. O mais abundante deles foi Proteobacteria, seguido de Chloroflexi e Cyanobacteria.

Genes relacionados à FBN se espalharam em vários táxons durante a evolução, por exemplo, sendo encontrados atualmente em bactérias pertencentes a doze gêneros dentro das classes de Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria (REMIGI et al., 2016), todos pertencentes ao filo Proteobacteria, mais abundantemente participando desta transformação nos solos analisados (Figura 7B).

No entanto, no que diz respeito a diversidade microbiana, por mais que a fixação do N tenha sido o processo menos abundante nas áreas, a quantidade de táxons que podem desempenhar essa função foi maior do que, por exemplo, a etapa da desnitrificação.

A etapa 2 representada na Figura 6 corresponde a assimilação de amônia. Nesta etapa foi encontrada a participação de 20 filos de microrganismos, sendo a mais diversa em táxons e também a mais abundante em sequências (28%). Este processo foi atribuído também primordialmente a bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria, seguidas por Actinobacteria e Acidobacteria, comumente encontradas como as mais numerosas em solos agrícolas (FIERER et al., 2012a; VEGA-AVILA et al., 2015; SCHMIDT e WALDRON, 2015). Observa-se que os grupos mais abundantes neste processo são também os mais abundantes de maneira geral nos solos. Esta correlação é esperada, uma vez que todos os organismos que assimilam nitrogênio para sua nutrição o fazem via este processo.

A etapa 3 é a desnitrificação, a qual foi atribuída a 8 filos microbianos. Dentro deste processo, está inserido a etapa 4 e 6, que correspondem a redução dissimilatória do nitrito e óxido nítrico sintase, respectivamente. A produção de NO (etapa 6) pode ser realizada por bactérias nitrificantes e desnitrificantes, mas estudos com isótopos marcados mostraram que em solos agrícolas são os microrganismos desnitrificantes os que desempenham melhor essa função (OPDYKE, OSTROM e OSTROM, 2009). Ao contrário das outras etapas do ciclo, o filo mais numeroso que podem desempenhar a produção de NO foi Actinobacteria, seguido de Proteobacteria e Acidobacteria (Figura 7B).

A etapa 5 representa o processo de amonificação a partir do nitrato e nitrito (DNRA), onde os microrganismos mais abundantes pertencem ao filo

Proteobacteria, seguidos por Actinobacteria. Não era esperado que esta via fosse identificada como uma das mais abundantes nos solos utilizados para o cultivo de cana-de-açúcar (Figura 6), pois este processo é tradicionalmente descrito em sistemas anaeróbicos como sedimentos e rúmen (ANDREOTE et al., 2012; COBELLIS, TRABALZA-MARINUCCI e YU, 2016). Porém, trabalhos recentes vêm mostrando que esta via pode ocorrer em maior atividade do que se pensa em ecossistemas terrestres (RÜTTING et al., 2011; THAMDRUP, 2012).

O filo Proteobacteria teve participação primordial no ciclo do N, representando o grupo mais numeroso relacionado ao metabolismo e transformação deste nutriente no solo. Este filo, segundo Schmidt e Waldron (2015) possui microrganismos de particular interesse, uma vez que o grupo inclui a maioria das espécies que catalisam reações de consumo de metano e produção de óxido nitroso, dois importantes gases de efeito estufa, diretamente ligados ao efeito de manejo de um solo agricultável.

Outra observação interessante foi a de que a diferença é visível entre a abundância dos filos entre as áreas. A Área J apresenta em todas as etapas o menor número de sequências dos táxons classificados. Esta área é destacada na tese como a menos produtiva, com solos menos férteis tendo os valores mais baixos dos macronutrientes Ca e Mg, além da MO, porém mais ricos em nitrato, além de serem mais arenosos (74%).

Em geral, filos como Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria e Chloroflexi estiveram presentes em todas as etapas de transformação do nitrogênio avaliadas, sendo o último em menor abundância. Na etapa da fixação do N, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes não foram identificados. Não era esperado não encontrar Actinobacteria, uma vez que são microrganismos comumente descritos como diazotróficos (GTARI et al., 2007). Quando se compara a abundância dos filos entre as áreas, a Área J se difere das demais como a que menos possui grupos com capacidade de desempenhar as diferentes reações do metabolismo do N. Mais detalhadamente, as RDAs (Anexo G e H) puderam mostrar as variáveis ambientais que mais influenciam na separação dos grupos entre as áreas de estudo.

Na RDA da via de fixação do N (Anexo GD), o filo mais abundante (Proteobacteria) foi representado no mesmo guadrante que a variável produtividade, sendo este fator o responsável pela maior explicação total da variação dos dados (19%), além da MO (3%) também ter sido importante nesta separação (Anexo H). Logo, quando se avaliam os grupos da via de assimilação da amônia, o nitrato presente nestes solos foi responsável por 43% da separação dos perfis microbianos, seguido de P (22%) e H+AI (13%) (Anexo GA e H). Já na via de amonificação do nitrato e nitrito (ou DNRA), o elemento magnésio representou a maior porcentagem de explicação total dos dados (33%) (Anexo H) e, na literatura não foi encontrado informação sobre efeito do Mg sob a comunidade microbiana. Nos processos de desnitrificação, a queima teve a porcentagem maior de explicação (41%), que possa talvez ser explicada como fator indutor na emissão de N2O para a atmosfera, elemento final de uma via parcial dentro da etapa completa da desnitrificação que, assim como os outros processos, é controlada por diversos fatores como o pH e umidade (RUDAZ et al., 1999). A via de óxido nítrico sintase está inserida dentro da desnitrificação e a única variável significativa na RDA foi produtividade com 16%. Adicionalmente, variáveis como V e carvão ativado explicaram 36 e 34%, respectivamente, os perfis microbianos com capacidade de desempenhar o processo de redução dissimilatória do nitrito.

Além destas observações, foi interessante notar a redundância metabólica existente nos processos. É importante atentar para a participação de mais grupos microbianos dentro de cada um destes processos, o que dá à eles manutenção em suas funcionalidades mesmo frente a variações ambientais, comuns em solos, caracterizados como sistemas altamente heterogêneos e dinâmicos. Embree e colaboradores (2015), por meio da metagenômica, confirmaram a existência de interações metabólicas em microrganismos desempenhando a ciclagem de nutrientes no solo. Além disso, avanços na ecologia microbiana revelam altos índices de diversidade de espécies e complexidade na maioria das comunidades, como em solos e águas marinhas (GANS et al., 2005; SOGIN et al., 2006), observação também feita nos dados desta tese. Esta complexidade do sistema também indica a possibilidade de alterações na ciclagem dos elementos frente a

alterações ambientais, sejam estas promovidas por eventos de contaminação do ambiente (SINGH et al., 2014), ou por alterações nos manejos agrícolas empregados. Num sistema de cultivo, estas alterações podem acarretar em alterações na ciclagem de nutrientes, alterando sua dinâmica no solo, e possivelmente refletindo no desenvolvimento das plantas. A visualização dos perfis funcionais submetidos a análise de PCA com altos valores de explicação dos eixos (Anexos IB, ID, JB, JD, LB e LD) separam, em sua maioria, os metagenomas da Área F dos outros, sugerindo que a ausência de aplicação do fertilizante mineral nestes solos podem promover a alteração nestas comunidades do ciclo do N.

A compreensão mais detalhada e profunda de como estas comunidades são estruturadas e a diversidade é mantida é um dos desafios da ecologia microbiana. Embora o uso de dados metagenômicos possa determinar facilmente o perfil da composição taxonômica e funcional presente no sistema, esta visão se limita ao potencial metabólico da comunidade no momento da amostragem. Metodologias futuras devem contemplar tanto a parte funcional destas comunidades bem como a dinâmica temporal das mesmas.

Devido a variabilidade na ocorrência de diferentes grupos microbianos participando das transformações do nitrogênio em cada área, os dados obtidos permitiram a busca por um grupo ou filo que esteja participando de todas transformações do ciclo do N nos solos de canaviais, bem como a descrição de um *core* microbiano (Figura 8 e 9), constituído por grupos comuns entre as áreas, onde participam das mesmas etapas de transformação do nitrogênio. Detalhes das informações nos Anexos I, J e L.

A ordem Sphingomonadales (filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria) foi identificada como representante do *core* microbiano destes solos (Figura 8), sendo membros desta ordem encontrados em todas as áreas, e participantes das diferentes transformações estudadas. A Área F detém o maior número de sequências afiliadas a esta ordem (55%), seguida da Área A (31%) e por fim da Área J (14%) (Figura 9). A literatura é pouco informativa sobre a funcionalidade de bactérias pertencente a esta ordem em sistemas agrícolas. No entanto, sabe-se que bactérias deste grupo possuem a habilidade de degradação de alguns compostos aromáticos, conforme o trabalho de Abbasian e colaboradores (2016), que mostrou a relação da alta concentração de petróleo no solo com a ocorrência destas bactérias, especialmente *Sphingomonas* sp.. Além disso, estas bactérias são descritas como adaptadas a ambientes com baixa concentração de carbono (EILER et al., 2003), encontradas em ecossistemas marinhos oligotróficos (MILLER et al., 2010; TANG et al., 2012) e também associados a formação de biofilmes (SHAW et al., 2014). Adicionalmente, Sphingomonadales são bactérias gramnegativas que possuem esfingolipídeos na membrana externa da parede celular e tem sido sugerido que estes lipídeos agem como barreira contra antibióticos, poluentes e solventes orgânicos (RAMOS et al., 2002, SUN et al., 2013).



Figura 8 – Afiliação taxonômica dos *reads* metagenômicos dos grupos microbianos associados ao metabolismo core do nitrogênio (nível de ordem) nos solos de cana. A figura mostra o resultado dos *datasets* completos submetidos à análise da base de dados SEED (*subsystem* nível 3) *vs* M5NR utilizando o *software* MG-RAST v3.5. O centro (*core*) representa a ordem identificada como recorrente em todas as transformações do elemento. Do centro da figura saem outras ordens identificadas como

participantes das diferentes etapas (Teste de ANOVA e post-hoc Tukey-Kramer a 0,95 corrigido por Benjamin-Hochberg FDR; *p*<0,05)

Interessante observar que o processo de FBN apresentou Sphingomonadales como a única ordem significativa entre as proporções presentes em todas as áreas de cultivo. Cerca de 55% dos *reads* afiliados a esta ordem estão presentes nos metagenomas da Área F (Figura 9). O uso da terra para o plantio da cana nesta área varia entre 10 e 40 anos, sendo a parcela de estudo com mais TCC. Estes solos são também manejados diferencialmente, com aplicação de torta de filtro e não possuem fertilização mineral. Estas variáveis podem indicar uma indução da multiplicação destas bactérias devido a estas práticas, o que deve ser posteriormente confirmado em experimentos controlados para esta finalidade.



Figura 9 – Afiliação taxonômica dos reads metagenômicos à ordem Sphingomonadales, caracterizada como o core microbiano dos solos de cana. A figura mostra o resultado da soma dos valores (três metagenomas) da abundância relativa de sequências (a) e a porcentagem delas (b) entre as três áreas de estudo (SEED Subsystem nível 3 vs M5NR; software MG-RAST v3.5)

Além de Sphingomonadales, outras ordens de microrganismos complementam o conjunto microbiano que se difere dos demais da comunidade (Figura 8). Do filo Proteobacteria, além de Sphingomonadales, encontram-se as ordens Vibrionales representando 1% na via de óxido nítrico sintase, Desulfuromonadales (28%), Xanthomonadales (12%) e *unclassified* 

*(derived from* Gammaproteobacteria) (2%) na via de redução dissimilatória do nitrito; Rickettsiales (2%) na etapa de assimilação da amônia e *unclassified (derived from* Episilonproteobacteria) representando 2% na via de amonificação do nitrato e nitrito. Outro filo é Cyanobacteria, com a presença das ordens Oscillatoriales com 12% de representação na etapa da assimilação de amônia e Nostocales com 28% na via de óxido nítrico sintase; já o filo Verrucomicrobia teve apenas a ordem Methylacidiphilales presente na via de óxido nítrico sintase, com 2%. Outro filo identificado foi Actinobacteria com as bactérias não-classificadas (3%) também na via de óxido nítrico sintase. O último filo descrito foi Bacteroidetes, com as ordens Sphingobacteriales e Cytophagales, ambas representando 36 e 24% na via da desnitrificação.

# 2.5.2.4 Descrição dos genes codificadores de enzimas relacionadas a transformações do N em solos cultivados com cana-de-açúcar

Por anos a microbiologia tem isolado microrganismos de diversos ambientes para descrever a conexão entre genes e funções peculiares em diversos processos metabólicos. A estudo das enzimas atuantes nos processos do ciclo do N foi em grande parte desenvolvido utilizando culturas axênicas, confirmando a função que alguns genes desempenham dentro do ambiente (STEIN e KLOTZ, 2016). A anotação de KOs (*KEGG Orthology*) e a classificação enzimática (E.C.) foram utilizadas na análise funcional do metabolismo do N e os valores foram normalizados de acordo com o valor total de *hits* dos dados metagenômicos (Figura 10; Anexo M e N). Adicionalmente, a análise funcional baseada em enzimas buscou o potencial genético da comunidade microbiana através de genes marcadores do ciclo do nitrogênio (LAURO et al., 2011) de todas as suas etapas. Nesta parte, as análises foram baseadas no banco de dados KEGG e complementam as anteriormente descritas, uma vez que algumas das enzimas identificadas participam de processos não descritos no item 2.5.2.3.

Foram identificadas 12 enzimas (Figura 10; Anexo M) pertencentes a classe das oxirredutases participantes do metabolismo do N em todos os solos cultivados com canaviais. Em geral, os solos da Área A mostraram

prevalência na abundância destas enzimas, com algumas exceções. Além disso, novamente a Área J apresentou valores mais baixos dos processos do ciclo, corroborando com o estudo das sequências afiliadas às diversas fases do ciclo discutidos anteriormente.

A enzima do processo de redução do nitrato (Figura 10 [1d]) (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>  $\rightarrow$  NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (E.C. 1.7.99.4) teve um papel importante dentro do ciclo, sendo encontrada em maior abundância (48%) dentre todas as enzimas identificadas. Conforme foi mostrado anteriormente (Item 2.5.2.3), o processo classificado como amonificação do nitrato e nitrito (Figura 7) é dividido em duas partes. A primeira delas, quando comparam-se os dados, referem-se as sequências afiliadas neste caso ao processo de redução do nitrato, que são enzimas codificadas pelos genes *nar*, *nap* e *nrf*, evidenciando a informação de que esta maior abundância corrobora com dados da Figura 6, os quais mostram a via da amonificação do nitrato e nitrito como a segunda mais ocorrente nos solos.

Já as enzimas de redução do nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NH<sub>3</sub>) (Figura 10 [2a, 2b e 2c]) (E.C. 1.7.2.2, 1.7.7.1 e 1.7.1.4) formam o segundo grupo mais numeroso nestes solos, com cerca de 40% de representação, codificadas pelos genes *nir* e que, segundo o KEGG, são enzimas capazes de transformar o nitrito em amônia. O processo de desnitrificação representou 11% da abundância de *hits* relacionados a duas enzimas (E.C. 1.7.2.1 e 1.7.99.7). A primeira delas é responsável pela conversão do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO (Figura 10 [1a]) codificadas pelo gene *nir*S e a segunda enzima que é codificada pelo gene *nor*B (Figura 10 [1b]) converte o NO a N<sub>2</sub>O. Em seguida, em menor número, vem a etapa da fixação do N (N<sub>2</sub> → NH<sub>3</sub>) (E.C. 1.18.6.1), com 0,7% de representação, seguida de nitritação (NH<sub>2</sub>OH → NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (E.C. 1.7.3.4) com 0,2% e redução da hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH → NH<sub>3</sub>) (E.C. 1.7.99.1) com 0,1%.



Figura 10 – Abundância relativa de hits classificados e atribuídos às enzimas de cada etapa do processos do ciclo do N. Redução do nitrato (1a a 1d;) Redução do nitrito (2a a 2c). O asterisco indica a diferença estatística significativa (Teste de ANOVA e post-hoc Tukey-Kramer a 0,95 corrigido por Benjamin-Hochberg FDR; p<0,05)</p>

No contexto geral, os solos cultivados com cana apresentam taxas mais altas de redução do nitrato e nitrito, que fazem parte do processo de desnitrificação. A desnitrificação incompleta ou parcial, no entanto, pode contribuir nas emissões de gases do efeito estufa (FLECHARD et al., 2005). Solos da Área J apresentaram menor abundância das nitrito e nitrato redutases, indicando de microrganismos uma menor presença desnitrificantes nestas áreas, provavelmente pelas características que os solos dessa área possuem. São mais arenosos, proporcionando um ambiente altamente rico em oxigênio, agente limitante do processo de desnitrificação (BARRET et al., 2016). Além disso, a concentração de nitrato nos solos amostrados é maior que amônio (Figura 2; Anexo B), sendo esta observação um indicativo de maiores valores de enzimas que utilizam o nitrato como precursor da via de redução até nitrito.

2.5.2.5 Predição da função do metabolismo do N a partir do sequenciamento do *amplicon* do gene ribossomal 16S DNAr por Illumina

O sequenciamento do *amplicon* do gene 16S DNAr por *Illumina HiSeq* 2000 foi feito concomitantemente ao metagenoma (Anexo O). Esta análise conferiu ganhos ao trabalho em diversos aspectos, principalmente nas confirmações dos dados e enriquecimento das análises.

A principal informação obtida destes dados foi a de que a afiliação de sequências de 16S DNAr à funções do metabolismo do nitrogênio confirma a proporção encontrada nos *datasets* do metagenoma (Figura 11a e 12). Genes marcadores como o 16S DNAr de bactérias e arquéias são frequentemente utilizados na caracterização taxonômica da composição e diversidade filogenética que existe nos mais distintos ambientes (LANGILLE et al., 2013).



Figura 11 – As bolhas (a) representam a abundância das sequências afiliadas aos diversos filos encontrados no sequenciamento do *amplicon* 16S rDNA. O diâmetro da cincunferência equivale aos valores de abundância comparados entre as áreas. PCA (b) dos perfis das comunidades microbianas baseada na análise taxonômica de Archaea e Bacteria utilizando valores de abundância relativa a nível de classe (M5NR *database*)

Observa-se pela análise de PCA com base nas sequências deste genes que a Área J se separa das demais, como previamente observado para as outras análises (Figura 11b). Com estes resultados, foi possível comparar e/ou validar as inferências taxonômicas obtidas pelo metagenoma. A metagenômica e o sequenciamento de *amplicon* (gene 16S DNAr) têm sido aplicados em diversos estudos de microbiomas, desde ambientes naturais (VENTER et al., 2004; MASON et al., 2014) até o corpo humano (QIN et al., 2010). Considerando o sistema solo um microbioma complexo e dinâmico, o sequenciamento do *amplicon* (resolução mais baixa e menos custoso) acoplado à metagenômica *shotgun* (resolução e custo maiores) podem ser consideradas ferramentas facilitadoras do entendimento destas comunidades microbianas que, anexado a um desenho experimental diferenciado, geram resultados altamente confiáveis. A informação funcional do metagenoma se complementa neste sentido, com a profundidade amostral desempenhada pelo sequenciamento dos genes ribossomais.

Portanto, o intuito deste esforço a mais foi buscar a abundância das sequências que estão relacionadas ao metabolismo do N, baseadas numa predição funcional de um *dataset* do gene ribossomal (Figura 12). A predição da ocorrência de genes relacionados às transformações do nitrogênio, realizada por meio do PICRUSt, corroboram os dados metagenômicos. Como se pode notar, a abundância destes grupos microbianos foi encontrada em menor quantidade na Área J, informação que condiz com as previamente descritas no item 2.5.2.3 (Figura 7). Dentro do contexto do trabalho, esta informação serve como uma característica importante para a confiabilidade dos dados gerados, mesmo sendo a um nível menos acurado (nível 1) de funcionalidade. Adicionalmente, esta foi uma forma de acoplar os resultados de sequenciamento e fazer uma comparação clara sobre como essas comunidades estão distribuídas nos solos utilizados para o cultivo da cana.



Figura 12 – Gráfico de pizza representando a abundância de sequências do sequenciamento do *amplicon* 16S DNAr afiliadas ao metabolismo do nitrogênio determinadas pelo *software* PICRUSt (nível 2); valores representam a soma de 3 repetições de cada área de estudo

## 2.5.3 Quantificação e avaliação da estrutura microbiana participante do ciclo do nitrogênio por qPCR e T-RFLP

Os dados abaixo descritos confirmam as evidências encontradas nos dados dos diferentes tipos de sequenciamento (metagenoma *shotgun* e *amplicons* do gene 16S DNAr). A quantificação dos genes funcionais *amo*A e *nif*H, bem como a estruturação das comunidades que possuem estes genes, são válidas e dão maior suporte as inferências sobre a ecologia microbiana relacionada as transformações do nitrogênio destes solos.

# 2.5.3.1 Abundância das comunidades microbianas envolvidas no ciclo do N

Como forma de validar as inferências previamente feitas nos metagenomas das áreas de cana, a abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, bactérias amônio-oxidantes (AOB) e arquéias amônio-oxidantes (AOA) foi determinada por PCR em tempo real. A eficiência de amplificação dos fragmentos foi de 0,86 para *nif*H, 0,93 para *amo*A de bactérias e 0,99 para *amo*A de arquéias. Os valores de regressão logarítmica das curvas obtidas (R<sup>2</sup>) foi de 0,99 para todas as quantificações. As quantificações, determinadas na unidade de log<sub>10</sub> g<sup>-1</sup> de solo, mostraram
maior abundância do gene *nif*H nos solos estudados, seguida de AOA e, por fim, de AOB (Figura 13A e 13B). A comparação entre a abundância destes grupos nas áreas estudadas apresentou diferença significativa para as quantificações dos genes *amo*A de bactérias e arquéias (Teste de Tukey, p<0,05).

As comunidades fixadoras de nitrogênio (*nif*H) apresentaram quantidades médias detectadas próximas a  $10^7$  cópias do gene ( $\log_{10} g^{-1}$ ) e foram as mais abundantes, sendo que na Área A variaram de 3,8.10<sup>6</sup> a 1,1.10<sup>7</sup>; na Área F apresentaram valores de 2,4.10<sup>6</sup> a 1,5.10<sup>7</sup> e na área J variaram de 1,3.10<sup>6</sup> a 2,2.10<sup>7</sup>. As comunidades de AOA variaram de 1,6.10<sup>6</sup> a 4,4.10<sup>6</sup> na Área A; 2,8.10<sup>5</sup> a 1,0.10<sup>6</sup> na Área F e 1,4.10<sup>5</sup> a 1,8.10<sup>6</sup> cópias do gene por grama de solo na Área J. Já as comunidades de AOB variaram de 9,9.10<sup>1</sup> a 2,0.10<sup>3</sup> na Área A; 1,7.10<sup>2</sup> a 1,4.10<sup>3</sup> na Área F e 3,0.10<sup>2</sup> a 7,1.10<sup>3</sup> cópias no gene por grama de solo na Área J (Figura 13A).



1,00E+00 1,00E+01 1,00E+02 1,00E+03 1,00E+04 1,00E+05 1,00E+06 1,00E+07 1,00E+08 1,00E+09

Figura 13 – Abundância das comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio de

vida livre (*nif*H), bactérias (AOB) e arquéias amônio-oxidantes (AOA) em solos das diferentes áreas amostradas. Os valores indicam a média, em  $log_{10}$ , de três repetições; as barras indicam o erro padrão gerado a partir das repetições (A). Os valores indicam a média, em  $log_{10}$ , dos valores de cópias do gene por grama de solo de 10 pontos; as barras indicam o erro padrão gerado a partir das repetições e as letras minúsculas representam diferença estatística (teste de Tukey, p<0,05) (B).

Dentro de cada uma das áreas foi também estudada a variabilidade dos dados de quantificação, os quais se mostraram mais variáveis para a detecção de AOB, como mostra o *boxplot* (Figura 14), enquanto que as quantificações do gene de AOA e *nif*H se mostraram mais constantes e uniformes.



Figura 14 – Boxplot mostrando a variação das cópias dos genes funcionais nos solos de cada área de estudo, identificando aonde se localizam 50% dos valores mais prováveis, a mediana e os valores extremos (barras) obtidos com a técnica de PCR em tempo real

As bactérias fixadoras do nitrogênio apresentaram abundância similar entre as três áreas. Alguns autores indicam que a maior abundância de tais organismos está relacionada com a maior presença de microagregados do solo, que proporcionam maiores condições de microaerofilia e anaerobiose, o que ajuda na ocorrência da fixação biológica do nitrogênio (GUPTA e ROPER, 2010; PEREIRA e SILVA et al., 2011). No entanto, tal relação não foi observada neste trabalho, uma vez que dentro dos parâmetros físicos dos solos, as áreas F e J apresentam teores de argila menores que os da Área A. Dentre estas áreas não foram observadas diferenças significativas na abundância deste gene. Possivelmente, a ausência de tal efeito se deva ao fato de ocorrer uma menor pressão de seleção destes fatores em áreas de cultivo agrícola, o que pode tornar as comunidades mais homogêneas. Além disso, dados apresentados pelo metagenoma mostraram que a FBN é o processo menos representado entre todos nos metagenomas. Assim sendo, a utilização de um gene marcador, como o *nif*H, facilita a observação destes microrganismos no solo. Outro fato que explica esta diferenciação na quantificação destes grupos pode estar relacionado a complexidade da anotação metagenômica, onde sequencias que podem atuar neste processo deixam de ser adequadamente anotadas.

Wakelin e colaboradores (2007) verificaram que a quantidade de microrganismos diazotróficos não diferiu quando houve aplicação de fertilizantes nitrogenados nos solos utilizados para o cultivo de milho. O trabalho destes autores estabeleceu tal hipótese com base no trabalho de Schwarz e colaboradores (1994), que observaram uma resposta direta, com uma diminuição na densidade deste gene em áreas que receberam a fertilização nitrogenada. Isto indica que vários fatores podem modular a abundância da comunidade de fixadores biológicos do nitrogênio, e um meio de se estabelecer quais são estes fatores é o estudo de correlações entre a abundância observada em função das mais distintas variáveis no ambiente estudado.

Neste trabalho, realizou-se uma análise de regressão entre os valores de quantificação do gene *nif*H (Y) e a variável ambiental (X). A quantificação das cópias obtidas do gene *nif*H se correlacionou significativamente (p=0,05) com pH do solo, sendo esta correlação válida para todas as amostras analisadas conjuntamente. Nestas análises foi observado que com o aumento do pH no solo, há também um aumento da abundância do gene *nif*H. É importante notar que este gene não demonstrou correlação com mais nenhum outro fator físico ou químico do solo, sugerindo o pH como o mais forte modulador da densidade de tal gene nos solos estudados.

Com relação aos grupos das bactérias amônio-oxidantes (AOB), verificou-se que este foi o grupo com menor abundância nos solos amostrados. A Área J apresentou maiores valores de cópia do gene *amo*A de bactérias (7,1.10<sup>3</sup>), diferindo esta área das demais (Tukey, p<0,05). Analisando a variação entre as áreas, a Área A teve, de forma geral, menores valores de quantificação para tal gene, com destaque para o ponto A10, o de

menor quantidade de bactérias amônio-oxidantes entre todos (9,92.10<sup>1</sup>). Possivelmente, a textura dos solos esteja relacionado a estas variações, sendo que condições de maiores quantidades de areia levam a maior disponibilidade de oxigênio, promovendo atividade de oxidação da amônia.

Nos solos analisados neste trabalho, a abundância do grupo das bactérias oxidadoras do amônio mostraram-se relacionados com outros fatores físicos e químicos que não o pH. Valores significativos foram encontrados para a correlação entre abundância de AOB e quantificações de amônio (p=0,02), nitrato (p=0,04), areia (p=0,03) e argila (p=0,04). Porém, foi testada a regressão linear correlacionando cada área de estudo separadamente (n=30) com todos os fatores citados anteriormente e os valores de p não foram significativos, indicando que as variações são válidas apenas na comparação entre as áreas distintas, mas não dentro de cada uma das delas.

As análises de regressão linear mostraram que solos com maiores teores de areia, nitrato e amônio favorecem a abundância das bactérias oxidadoras do amônio, ao passo que solos mais argilosos apresentaram, nesta análise, menores abundâncias destas comunidades microbianas. Notase que estes resultados sugerem que, especialmente em solos utilizados para o cultivo dos canaviais, AOB prefere nichos aeróbicos e com altas taxas de nitrato e amônio (VERHAMME et al., 2011). Destaca-se ainda que o fato de existir altas quantidades de amônio pode levar a maior atividade de tais organismos, dando origem assim aos altos teores de nitrato observados. Se isto for acoplado à ocorrência de altos teores de matéria orgânica, a quantidade de amônio deve permanecer alta, devido ao processo intenso de amonificação.

O grupo das arquéias amônio-oxidantes (AOA) foi mais abundante que o de bactérias que realizam tal função, com quantidades variando entre 1,4.10<sup>5</sup> a 4,4.10<sup>6</sup>, tendo os solos da Área A como os mais abundantes em tal comunidade. Além de sua ubiqüidade (SZUKICS et al., 2012), AOA parece prosperar sobre AOB em uma ampla gama de ambientes e em muitos tipos de solos (ERGUDER et al., 2009; LEININGER et al., 2006). No entanto, desconhece-se ainda se sua funcionalidade é equivalente às bactérias amônio-oxidantes, bem como suas exigências e responsividade às condições

75

ambientais e de manejo (FRANCIS et al., 2007; NICOL e SCHLEPER, 2006; PROSSER e NICOL, 2008; KE et al., 2013). Estudos recentes indicaram que AOA podem ser altamente ativas no processo de oxidação da amônia, particularmente quando este íon se apresenta em baixas concentrações (GUBRY-RANGIN et al., 2010, PRATSCHER et al., 2011; STEWART et al., 2011), enquanto que AOB prefere concentrações relativamente elevadas de amônia (VERHAMME et al., 2011). Portanto, os dados deste trabalho corroboram a literatura, uma vez que se têm maiores taxas de nitrato do que amônio nos solos dos canaviais estudados, juntamente com a maior abundância de AOA.

As quantificações do gene *amo*A de arquéias de todas as áreas de estudo apresentaram correlação significativa (*p*=0,0001) apenas com o teor de areia (g/kg) encontrado nos solos. Segundo a análise, a quantidade de cópias do gene *amo*A de arquéias diminui conforme o teor de areia (g/kg) no solo aumenta, sugerindo a eficiência do metabolismo microbiano das arquéias oxidadoras do amônio em ambientes possivelmente com menores teores de oxigênio. Isto corrobora a literatura (LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2011; PRATSCHER et al., 2011), e indica esta complementaridade entre as funções de bactérias e arquéias neste processo. Adicionalmente a estas informações, a Área A mostrou possuir a maior abundância de AOA, onde também ocorrem solos mais argilosos, indicando a validade de tal correlação.

Infelizmente não foi possível inferir sobre a comunidade amôniooxidante por meio do metagenoma. A anotação do gene *amo* não foi identificada baseada no banco de dados SEED *Subsystems*, portanto não há como comparar tais observações feitas pelo qPCR para estas comunidades microbianas.

## 2.5.3.2 Estrutura das comunidades amônio-oxidantes nos solos de canaviais

Além da quantificação dos genes funcionais do ciclo do nitrogênio, a descrição da estrutura das comunidades acessadas foi feita pela metodologia de T-RFLP, a qual se mostrou eficaz para um total de 30 amostras ao estudo de AOB e 53 amostras ao estudo de AOA (num total de 83 amostras). As

análises de T-RFLP forneceram um total de 508 grupos distintos (picos) para o grupo das arquéias amônio-oxidantes e 224 para bactérias amôniooxidantes, com fragmentos variando de 50 a 600 pb e 50 a 598 pb para AOA e AOB, respectivamente. Com isto, foi possível mostrar como a estrutura das comunidades oxidadoras de amônio estão dispostas nas áreas acessadas. Estes dados serviram também para se estabelecer relações entre as estruturas observadas e características físicas e químicas do solo.

Inicialmente, a distribuição das amostras foi verificada por meio de análise de coordenadas principais (PCoA), realizadas com base na matriz de similaridade Bray-Curtis. Esta análise é amplamente usada para verificar agrupamentos com base na beta-diversidade, embasando os agrupamentos nas semelhanças observadas entre comunidades distintas (KNIGHTS, COSTELLO e KNIGHT, 2011). Os perfis de AOB agrupados explicaram nos dois primeiros eixos um total de 18,6% da variância dos dados, enquanto que a explicação para AOA foi de 26,1%. Numa análise comparativa, é possível observar um agrupamento das comunidades de AOB entre as áreas, o que é mais dificilmente determinado para AOA (Figura 15).



Figura 15 – Gráficos de PCoA ilustrando as separações entre as comunidades de bactérias e arquéias amônio-oxidantes nas três áreas utilizando a matriz de similaridade Bray-Curtis

Os dados de AOB indicam uma maior similaridade entres os perfis das áreas A e F, sendo a Área J aquela com a comunidade mais distinta de AOB. Pode-se também indicar que as amostras da Área F apresentam perfis mais similares (com exceção de uma amostra), enquanto que as amostras das

áreas A e J apresentam maiores variações em suas estruturas. Estas características e a separação das áreas foram avaliadas com base no teste de ANOSIM (Tabela 3), que indicou o valor de R=0,52 para a comparação entre as áreas F e J, indicando que estas compartilham certa semelhança. As demais comparações indicaram não haver diferenças significativas nas comunidades avaliadas nas distintas áreas, sendo os grupos de AOA ainda mais semelhantes.

Tabela 3 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade *Jaccard* utilizando os dados de T-RFLP

Área	AOB	AOA
Área A		
Х	0,161	0,044
Área F		
Área A		
х	0,301	0,034
Área J		
Área F		
х	0,521*	0,004
Área J		

\*valores de ANOSIM estatisticamente diferentes

Na Área J foram encontrados os maiores valores de cópias do gene amoA de bactérias, e nesta área ocorre também a única diferenciação observada referente a estruturação das comunidades de AOB, sugerindo que os solos desta área apresentam uma condição diferencial aos demais para o estabelecimento e possivelmente para a funcionalidade de tal grupo de organismo. Uma possível diferença é o TCC de tal solo, sendo esta a área mais jovem entre as estudadadas (Tabela 3). Outra particularidade desta área é a aplicação de torta de filtro em tais solos, o que pode levar a geração de condições químicas específicas.

Como forma de complementar os dados, a análise de redundância (RDA) foi utilizada, dando base para determinar a correlação dos dados microbiológicos das áreas com as características físicas e químicas dos solos. Além disso, esta análise estabelece quais das principais variáveis analisadas se correlacionam de forma mais íntima com a variância da

estrutura das comunidades oxidadoras de amônio, conforme discutido no contexto da metagenômica destes solos.

Os poucos fatores ambientais que tiveram significância estatística (*p*<0,05) apresentaram baixa explicação dos dados. Esta significância foi encontrada apenas para o grupo das AOB, que mostraram modulação pelos fatores H+AI (1,17%), amônio (1,1%), MO (1,1%) e V (0,2%). Esta mesma condição aconteceu para um trabalho que faz parte do projeto temático (GUMIERE, 2013), onde foi demonstrada a baixa explicação de tais variáveis para a estruturação das comunidades de fungos em tais áreas. No entanto, apesar desta baixa significância das correlações, foi possível observar nesta análise que a Área J se diferencia das demais, e possivelmente tal diferenciação se deva a alta correlação com os valores de nitrato, amônio e areia, indicando novamente a relação da estrutura de AOB com estes fatores físico-químicos (Anexo Q).

O grupo das arquéias amônio-oxidantes mostrou-se disperso estruturalmente, não havendo agrupamento das áreas. Nota-se que o fator nitrato no solo correlacionou-se com os perfis das comunidades de AOA da Área J. Já a parte física do solo evidenciou melhor a separação dos perfis das três áreas, correlacionando as quantidade de silte e argila com os solos da Área A, opostamente a argila, que mostrou a separação destes grupos microbianos na Área J com alguns pontos da Área F.

Segundo Habteselassie, Xu e Norton (2013), o impacto gerado pela aplicação de fertilizantes nitrogenados no solo causou mudanças apenas na abundância de ambas as comunidades amônio-oxidantes, enquanto que a sua composição se comportou de forma relativamente estável. Tendo em vista os resultados de T-RFLP de AOA, nota-se que a distribuição da estrutura destes microrganismos não diferiu nas áreas, sugerindo assim que existe um padrão estável entre elas quando comparadas as três áreas que se diferem em vários quesitos, como por exemplo, o TCC e fertilização.

Por fim, metodologias de maior sensibilidade como o metagenoma shotgun e amplicon do gene 16S DNAr não foram capazes de verificar a presença destes grupos nos solos, pois era esperado através delas evidenciar de uma forma mais acurada as diferenças existentes nestas comunidades, ou mesmo para comprovar esta baixa responsividade das mesmas frente a diferentes condições ambientais. Portanto, esta observação na estruturação microbiana não pôde ser validada, porém a interpretação dos dados adquiridos pelo T-RFLP são de grande interesse e importância na busca pela compreensão de como estes grupos microbianos se comportam em solos agrícolas perante as diversas variações no ambiente.

80

## **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O acesso a biodiversidade microbiana do solo por metodologias de sequenciamento de DNA gera dados de grande magnitude, mas também de difícil interpretação e validação. Consiste sempre um grande desafio a obtenção de informações sobre este tipo de dados, principalmente relacionadas ao que realmente ocorre dentro de uma área de produção agrícola.

Observando os dados obtidos neste trabalho, podemos concluir em alguns pontos importantes. Os dados de caracterização das áreas indicam a variabilidade de ambientes sobre os quais encontram-se cultivos de cana-deaçúcar. Esta variabilidade certamente interfere no desempenho das plantas gerando distintos valores de produtividade em cada uma das áreas. Certamente, estas variações devem também interferir na estruturação e no funcionamento das comunidades microbianas que colonizam estes solos.

Em relação a comunidade microbiana, inicialmente pode-se verificar que os filos Proteobacteria e Chloroflexi apresentaram-se como os mais abundantes em genes que podem codificar para proteínas envolvidas nas transformações do nitrogênio no solo, sendo Proteobacteria um grupo mais numeroso nos solos analisados, e Chloroflexi um grupo de baixa frequência nos mesmos solos.

Variáveis ambientais, tanto relacionadas ao manejo das culturas, como a resposta a estes, a queima, aplicação de torta de filtro e carvão ativado, além de produtividade, mostraram correlações significativas com a estruturação das comunidades microbianas atuantes nas transformações do nitrogênio. Além destas variáveis, algumas características dos solos também foram significativas sob esses grupos, tais como concentração de nitrato, P, H+AI, V, Mg, CTC e MO.

A assimilação da amônia mostrou-se a etapa mais representada em abundância de organismos capazes de realizar as transformações do nitrogênio nos solos, sugerindo uma grande redundância metabólica existente nestes processos nos solos avaliados. Além desta etapa, foi verificado a presença de muitos organismos carregando genes que codificam enzimas relacionadas com a redução do nitrato e nitrito, sendo estes observados em menor ocorrência nos solos da Área J, que também mostrouse a mais distinta em outros processos analisados. Pode-se sugerir que características peculiares dos solos da Área J determinaram a distinção da diversidade microbiana funcional neste solos. Possivelmente, estas variações, tanto no manejo como de características do solo, como na microbiota residente nos mesmos, podem explicar a menor produtividade encontrada nesta região.

Destaca-se ainda nos resultados obtidos a baixa frequência de genes relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio. Este fato não era esperado pela quantidade de trabalhos associados a esta etapa do ciclo e sua reconhecida importância. Isto indica que as bactérias que atuam neste processo na verdade compõem um grupo minoritário no solo quando comparado aqueles promotores de outros processos de transformação do nitrogênio no solo. Esta afirmação fica mais evidente quando se observam os dados de quantificação do gene *nif*H, os quais mostram maior abundância quando comparados ao gene *amo*A de bactérias e arqueias, sendo este último não identificado no sequenciamento do metagenoma. Mesmo comunidades pouco abundantes mostraram-se diferenciadas na Área J, como observado para o estudo com os genes *amo*A de bactérias.

As inferências realizadas nos dados de metagenoma foram também correlatas com os dados de sequenciamento do *amplicon* 16S DNAr, o que pode servir como base no futuro para estudos de predição genômica em microbiomas de solos agrícolas.

Adicionalmente, os resultados obtidos neste trabalho compõem um estudo de grande importância para o entendimento do papel microbiano nas transformações do nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar, mesmo que as diferenças encontradas tenham sido pontuais. Este trabalho é inovador por acessar de forma conjunta todas as comunidades envolvidas neste ciclo, caracterizadas por metagenômica, o que evita os problemas inerentes ao cultivo microbiano. Por fim, a disponibilização deste banco de dados servirá para estudos posteriores, ou na geração de hipóteses mais consistentes que permeiam todas as possibilidades do uso microbiano na melhor eficiência do uso do nitrogênio para a nutrição de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F.; PALANISAMI, T.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.; LOCKINGTON, R.; RAMADASS, K. Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. **Biotechnology progress**, doi:10.1002/btpr.2249, 2016.
- ABOIM, M.C.R.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; BARBOSA, J.C.; ROSADO, A.S. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in southeaster Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 100-108, 2008.
- ADORNA, J.C.; CRUSCIOL, C.A.C.; ROSSATO, O.B. Fertilization with filter cake and micronutrients in plant cane. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 649-657, 2013.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). Methods in applied soil microbiology and biogeochemistry. London, Academic Press, 1995. 576 p.
- ANDREOTE, F.D.; JIMÉNEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; MELO, I.S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 6, p. e38600, 2012.
- ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **ISME Journal**, London, v.4, p.553-563, 2010.
- **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 14, p. 4744–4749, 2010.
- ARMAS, R.; VALADIER, M.H.; CHAMPIGNY, M.L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal Plant Physiology**, New York, v. 140, p. 531-535, 1992.
- BANDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. Functional Plant Biology, Victoria, v.29, p.417-423, 2002.
- BARRET, M., KHALIL, M.I.; JAHANGIR, M.M.; LEE, C.; CARDENAS, L.M.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. Carbon amendment and soil depth affect the distribution and abundance of denitrifiers in agricultural soils. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2016.
- BENDER, S.F.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses. **Journal of Applied Ecology**, Hoboken, v. 52, p. 228-239, 2015.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), London, p. 289-300, 1995.
- BERTHRONG, S.T.; YEAGER, C.M.; GALLEGOS-GRAVES, L.; STEVEN, B.; EICHORST, S.A.; JACKSON, R.B.; KUSKE, C.R. Nitrogen Fertilization Has a Stronger Effect on Soil Nitrogen-Fixing Bacterial Communities than Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub>. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 80, p. 3103-3112, 2014.
- BERTOLANI, F.C.; FORTI, J.A.; PENATTI, C.P.; SILVA, P.C.; SARTO, C.A.; BERNARDES, M.R.; FORTES, C.; FARONI, C.E. Adubação com

micronutrientes na cultura da cana-de-açúcar –safra 05/06. CTC – **Relatório técnico de projeto P & D**. 12p. 2007.

- BESAURY, L.; GHIGLIONE, J.; QUILLET, L. Abundance, activity, and diversity of archaeal and bacterial communities in both uncontaminated and highly copper-contaminated marine sediments. Marine biotechnology, New York, v. 16, n. 2, p. 230-242, 2014.
- BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3769-75, 1998.
- BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar. Riberão Preto: Instituto Agronômico, v.1, p. 205-220, 2008.
- BÜRGMANN, H.; WIDMER, F.; VON SIGLER, W.; ZEYER, J. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 240–247, 2004.
- CALDERÓN, F.J., JACKSON, L.E., SCOW, K.M., ROLSTON, D.E. Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 118–126, 2001.
- CANÇADO, J.E.D.; SALDIVA, P.H.N.; PEREIRA, L.A.A.; LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.. The impact of sugarcane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. **Environmental Health Perspect**, New York, v. 114, p. 725-729, 2006.
- CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., COSTELLO, E.K., FIERER, N., PENA, A.G., GOODRICH, J.K., GORDON, J.I., HUTTLEY, G.A., KELLEY, S.T., KNIGHT, D., KOENIG, J.E., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., MCDONALD, D., MUEGGE, B.D., PIRRUNG, M., REEDER, J., SEVINSKY, J.R., TURNBAUGH, P.J., WALTERS, W.A., WIDMANN, J., YATSUNENKO, T., ZANEVELD, J., KNIGHT, R. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. Nature Methods, London, v. 7, p. 335-336, 2010.
- CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY.J; FIERER, N.; GORMLEY, N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.
- CARNEY, K.M.; MATSON, P.A.; BOHANNAN B.J.M. Diversity and composition of tropical soil nitrifiers across a plant diversity gradient and among land-use types. **Ecology Letters**, Hoboken, v. 7, p. 684–694, 2004.
- CASCIOTTI, K.L.; WARD, B.B. Dissimilatory Nitrite Reductase Genes from Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. **Apllied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2213-2221, 2001.
- CERRI, D.G.P.; MAGALHÃES, P.S.G. Correlation of physical and chemical attributes of soil with sugarcane yield. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 4, p. 613-620, 2012.

- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C; ARRUDA, P.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; FIILGUEIRAS, T.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W.J.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. Tropical Plant Biology, New York, v. 4, p. 62–89, 2011.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste management**, Kidlington, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.
- CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H.; HOWARTH, R.W. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, p. 623–645, 1999.
- COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; YU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science of The Total Environment**, v. 545, p. 556-568, 2016.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (Imprensa/Notícias e Levantamento de Safras, 2014/15). Disponível em: <<u>www.conab.gov.br</u>>. Acesso em 12 maio 2016.
- CORBIÈRE-NICOLLIER, T.; BLANC, I.; ERKMAN, S. Towards a global criteria based framework for the sustainability assessment of bioethanol supply chains. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 11, p. 1447-1458, 2011.
- COURTAILLAC, N., BARAN, R., OLIVER, R., CASABIANCA, H., GANRY, F. Efficiency of Nitrogen Fertilizer in Sugarcane-Vertical System in Guadeloupe According to Growth and Ratoon Age of the Cane. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 52, p. 9-17, 1998.
- DE LIMA, R.P.; DE LEÓN, M.J.; DA SILVA, A.R. Comparação entre dois penetrômetros na avaliação da resistência mecânica do solo à penetração. **Revista Ceres**, cidade, v. 60, n. 4, p. 577-581, 2013.
- DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.336, p. 337-349, 2010.
- DINI-ANDREOTE, F.; PYLRO, V.S.; BALDRIAN, P.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Ecological succession reveals potential signatures of marine-terrestrial transition in salt marsh fungal communities. The ISME Journal, London, doi:10.1038/ismej.2015.254, 2016.
- DJIK, E.; ECK, N. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown dactylorhiza-incarnata seedlings. **New Phytologist**, Oxford, v. 131, p. 361-367, 1995.
- DONG, L.F.; SMITH, C.J.; PAPASPYROU, S.; STOTT, A.; OSBORN, A.M.; NEDWELL, D.B. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 75, p. 3171-3179, 2009.

- DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and addessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.)
   Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 3-21.
- DOS SANTOS, P.C.; FANG, Z.; MASON, S.W.; SETUBAL, J.C.; DIXON, R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC genomics**, London, v.13, p. 162, 2012.
- DWYER, L.M.; ANDERSON, A.M.; MA, B.L.; STWART, D.L.; TOLLENAAR, M.; GREGORICH, E. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, p. 179-182, 1995.
- EILER, A.; LAGGENHEDER, S.; BERTILSSON, S.; TRANVIK, L.J. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at diferente natural organic carbon concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3701-3709, 2003.
- ELSAYED, M.T.; BABIKER, M.H.; ABDELMALIK, M.E.; MUKHTAR, O.N.; MONTANGE, D. Impact of filter mud applications on the germination of sugarcane and small-seeded plants and on soil and sugarcane nitrogen contents. **Bioresource Techonology**, Oxford, v. 99, p. 4164-4168, 2008.
- EMBREE, M.; LIU, J.K.; AL-BASSAM, M.M.; ZENGLER, K. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.112, p. 15450-5, 2015.
- ERGUDER, T.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 855-869, 2009.
- ETTEMA, C.H.; WARDLE, D.A. Spatial soil ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 17, p. 177-183, 2002.
- FALKOWSKI, P.G.; FENCHEL, T.; DELONG, E.F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. Science, Washington, v. 320, n. 5879, p. 1034–1038, 2008.
- FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest.
- FARONI, C.E.; DONZELLI, J.L.; FORTI, J.A.; PENATTI, C.P.; SILVA.P.C. Calibração de adubação nitrogenada e potássica em cana soca colhida sem a queima da palha – Safra 08/09. Relatório técnico de P & D. Centro de Tecnologia Canavieira. Piracicaba – SP, 2009. 52p.
- FARONI, C.E.; PENATTI, C.P.; FORTI, J.A.; SILVA, P.C. Subprodutos Agroindustriais na nutrição da cana-de-açúcar – Safra 10/11. Relatório técnico de P & D. Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba – SP. 2011. 45p.
- FERREIRA, S.S.; HOTTA, C.T.; POELKING, V.G.; LEITE, D.C.; BUCKERIDGE, M.S.; LOUREIRO, M.E.; BARBOSA, M.H.; CARNEIRO, M.S.; SOUZA, G.M. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 91, p. 15-35, 2016.

- FIERER, N.; LAUBER, C.L.; RAMIREZ, K.S.; ZANEVELD, J.; BRADFORD, M.A.; KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. The ISME journal, London, v. 6, n. 5, p. 1007-1017, 2012a.
- FIERER, N.; LEFF, J.W.; ADAMS, B.J.; NIELSEN, U.N.; BATES, S.T.; LAUBER, C.L.; OWENS, S.; GILBERT, J.A.; WALL, D.H.; CAPORASO, J.G. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, p. 21390-21395, 2012b.
- FIGUEROLA, E.L.M.; GUERRERO, L.D.; TÜRKOWSKY, D.; WALL, L.G.; ERIJMAN, L. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. Environmental Microbiology, Washington, v. 17, p. 678-688, 2015.
- FISHER, W.D. On grouping for maximum homogeneity. Journal of the American statistical Association, Alexandria, v. 53, n. 284, p. 789-798, 1958.
- FLECHARD, C.R.; NEFTEL, A.; JOCHER, A.; AMMAN, C.; FUHRER, J. Bidirectional soil/atmosphere N<sub>2</sub>O exchange over two mown grassland systems with contrasting management practices. **Global Change Biology**, v. 11, n. 12, p. 2114-2127, 2005.
- FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **ISME Journal**, London, v. 1, n.1, p. 19–27, 2007.
- FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.; BEMAN, J.M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 102, n. 41, p. 14683–14688, 2005.
- FUJITA, H.; AOKI, S.; KAWAGUCHI, M. Evolutionary dynamics of nitrogen fixation in the legume–rhizobia symbiosis. PloS One, São Francisco, v. 9, n. 4, p. e93670, 2014.
- GABY, J.C.; BUCKLEY, D.H. A global census of nitrogenase diversity. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, p. 1790-1799, 2011.
- GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. Geoderma, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 347-352, 2009.
- GALLOWAY, J.N.; TOWNSEND, A.R.; ERISMAN, J.W.; BEKUNDA, M., CAI, Z.; FRENEY, J.R.; MARTINELLI, L.A.; SEITZINGER, S.P., SUTTON, M.A. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. Science, Washington, v. 320, p. 889-892, 2008.
- GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, New York, v. 309, p. 1387-1390, 2005.
- GARIBALDO, S.; FORTERRE, P.; BROCHIER-ARMANET, C. Archaea and the tree of life. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 1-4, 2011.
- GHALEY, B.B.; HØGH-JENSEN, H.; CHRISTIANSEN, J.L. Recovery of nitrogen fertilizer by traditional and improved rice cultivars in the Bhutan Highlands. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 332, n. 1-2, p. 233-246, 2010.

- GIANCHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar. **Revisão de Literatura. Rev. cient.** electron. agron, v. 3, p. 1-15, 2009.
- GIBLIN, A.E., C.R. TOBIAS, B. SONG, N. WESTON, G.T. BANTA, AND V.H. RIVERA-MONROY. 2013. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. **Journal of Oceanography**, Dordrecht, v. 26, p. 124-131, 2013.
- GILBERT, J.A.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. **BMC Biology**, London, v. 12, n.1, p. 69, 2014.
- GRIFFITHS, R.I.; BAILEY, M.J.; McNAMARA, N.P.; WHITELEY, A.S. The functions and components of the Sourhope soil microbiota. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 114–126, 2006.
- GTARI, M.; BRUSETTI, L.; HASSEN, A.; MORA, D.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Genetic diversity among Elaeagnus compatible Frankia strains and sympatric-related nitrogen-fixing actinobacteria revealed by nifH sequence analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 39, n. 1, p. 372-377, 2007.
- GUBRY-RANGIN, C.; HAI, B.; QUINCE, C.; ENGEL, M.; THOMSON, B.C.; JAMES, P. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 108, n. 12, p. 21206-21211, 2011.
- GUMIERE, T. Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar. 2013. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <a href="http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-15032013-091452/">http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-15032013-091452/</a>. Acesso em: 2015-11-16.
- GUMIERE, T.; DURRER, A.; BOHANNAN, B.J.M.; ANDREOTE, F.D. Biogeographical patterns in fungal communities from soils cultivated with sugarcane. **Journal of Biogeography**, Oxford, (In Press), doi:10.1111/jbi.12775, 2016.
- GUPTA, V.V.S.R.; ROPER, M.M. Protection of free-living nitrogen-fixing bacteria within the soil matrix. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 50–54, 2010.
- HABTESELASSIE, M.Y.; XY, L.; NORTON, J.M. Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.4, n.326, 2013.
- HALLIN, S.; LINDGREN, P.E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1652-7, 1999.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN P.D. "PAST–Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, versão.
   1.73. Paleontologia Electronica, Milano, v. 4, p. 1-9, 2001.
- HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 316, p. 13-24, 2009.

- HASHIMOTO, S. A New Estimation of Global Soil Greenhouse Gas Fluxes Using a Simple Data-Oriented Model. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n. 8, 2012.
- HOFSTRA, N.; BOUWMAN, A.F. Denitrification in agricultural soils: summarizing published data and estimating global annual rates. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 72, n. 3, p. 267-278, 2005.
- HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, p. 2965-2982, 1996.
- HUG, L.A.; BAKER, B.J.; ANANTHARAMAN, K.; BROWN, C.T.; PROBST,
  A.J.; CASTELLE, C.J.; BUTTER, C.N.; HERNSDORF, A.W.; AMANO,
  Y.; ISE, K.; SUZUKI, Y.; DUDEK, N.; RELMAN, D.A.; FINSTAD, K.M.;
  AMUNDSON, R.; THOMANS, B.C.; BAN, J.F. A new view of the tree of
  life. Nature Microbiology, v. 1, p. 16048, 2016.
- ISHIKAWA, M.; OHMORI, Y.; TANAKA, W.; HIRABAYASHI, C.; MURAI, K.; OGIHARA, Y.; HIRANO, H.Y. The spatial expression patterns of DROOPING LEAF orthologs suggest a conserved function in grasses. **Genes & Genetic Systems**, Mishima, v. 84, n. 2, p. 137-146, 2009.
- JANKE, L.; LEITE, A.; BATISTA, K.; WEINRICH, S.; STRÄUBER, H.; NIKOLAUSZ, M.; NELLES, M.; STINNER, W. Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 199, p. 235-244, 2016.
- JANSSON, J.K.; TAŞ, N. The microbial ecology of permafrost. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 414-425, 2014.
- JIA. Z.J.; CONRAD. R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, p. 1658–1671, 2009.
- JORIS, H. A., SOUZA, T. R., MONTEZANO, Z. F., VARGAS, V. P., CANTARELLA, H. Evaluating Nitrogen Behavior in Sugarcane after Fertilization Using Leaf and Sap Extract Analyzes. **American Journal of Plant Sciences**, 2014.
- JUNIOR, F.B.R.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, E.J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, p. 985-994, 2000.
- KE, X.; ANGEL, R.; LY, Y.; CONRADO, R. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil. Environmental Microbiology, Washington, v. 15, n. 8, p. 2275-2292, 2013.
- KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE, L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). Methods of soil analysis. Pt 2: Chemical and Microbiological Properties American Society of Agronomy. Madison :Soil Science of America, 1982. p. 643–698.
- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, **Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.
- KIBBLEWHITE, M.G.; RITZ, K.; SWIFT, M.J. Soil health in agricultural systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 685-701, 2008.
- KNIGHTS, D.; COSTELLO, E.K.; KNIGHT, R. Supervised classification of human microbiota. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v.35, n. 2, p. 343-359, 2011.

- KONOPA, A. Microbial ecology: searching for principles. **Microbe**, cidade v. 1, n. 4, p. 175-179, 2006.
- KUMAR, V.; SINGH, P.; JORQUERA, M.A.; SANQWAN, P.; KUMAR, P.; VERMA, A.K.; AGRAWAL, S. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 29, p. 1361-1369, 2013.
- LA SCALA JUNIOR, N.; BOLONHEZI, D.; PEREIRA, G.T. Shot-term soil CO<sub>2</sub> emission after conventional and reduced tillage of a no-till sugar cane area in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 91, p. 244-248, 2006.
- LAM, P.; KUYPERS, M.M. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. Annual Review of Marine Science, Palo Alto, v. 3, p. 317–345, 2010.
- LANGILLE, M.G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J.G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J.A.; BEIKO, R. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. Nature biotechnology, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.
- LAURO, F.M.; DEMAERE, M.Z.; YAU, S.; BROWN, M.V.; NG, C.; WILKINS, D.; CAVICCHIOLI, R. An integrative study of a meromictic lake ecosystem in Antarctica. **ISME Journal**, London, v. 5, n. 5, p. 879-895, 2011.
- LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Washington, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.
- LEHTOVIRTA-MORLEY, L.E.; STOECKER, K.; VILCINSKAS, A.; PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 38, p. 15892-15897, 2011.
- LEIGH, J.A.; DODSWORTH, J.A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 61, p. 349-377, 2007.
- LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, n. 7104, p. 806-809, 2006.
- LEVY-BOOTH, D.J.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 75, p. 11-25, 2014.
- LEWIS, O.A.M. (Ed.) **Plants and nitrogen**. London, Editora Cambridge, 1986. 100 p.
- LIGI, T.; TRUU, M.; TRUU, J.; NÕLVAK, H.; KAASIK, A.; MITSCH, W.J.; MANDER, Ü. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (nirS, nirK, and nosZ) abundances in a created riverine wetland complex. **Ecological Engineering**, v. 72, p. 47-55, 2014.
- LIMA-PERIM, J.E.; ROMAGNOLI, E.M.; DINI-ANDREOTE, F.; DURRER, A.; DIAS, A.C.; ANDREOTE, F.D. Linking the Composition of Bacterial and Archaeal Communities to Characteristics of Soil and Flora Composition in the Atlantic Rainforest. **PIoS One**, São Francisco, v. 11, n. 1, p. e0146566-e0146566, 2016.

- LLORENS-MARÈS, T.; YOOSEPH, S.; GOLL, J.; HOFFMAN, J.; VILA-COSTA, M.; BORREGO, C.M.; CASAMAYOR, E.O. Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. **ISME Journal**, London, v. 9, n. 7, p. 1648-1661, 2015.
- LOGUE, J.B.; LINDSTROM, E.S. Species sorting affects bacterioplankton community composition as determined by 16S rDNA and 16S Rrna fingerprints. **ISME Journal**, London, v. 4, p. 729–738, 2010.
- LU, W-W.; ZHANG, H-L.; SHI, W-M. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an anaerobic agricultural soil as affected by glucose and free sulfide. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 58, p. 98-104, 2013.
- LUNDQUIST, E.J., SCOW, K.M., JACKSON, L.E., USEGI, S.L., JOHNSON, C.R. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. **Soil Biology** & **Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1661–1675, 1999.
- LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, I.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.26, p.1829–1836, 2010.
- LYUBCHIK, S.I.; LYUBCHIK, A.I.; GALUSHKO, O.L.; TIKHONOVA, L.P.; VITAL, J.; FONSECA, I.M.; LYUBCHIK, S.B. Kinetics and thermodynamics of the Cr (III) adsorption on the activated carbon from co-mingled wastes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 242, n. 1, p. 151-158, 2004.
- MACHIDA, M.; KIKUCHI, Y.; AIKAWA, M.; TATSUMOTO, H. Kinetics of adsorption and desorption of Pb (II) in aqueous solution on activated carbon by two-site adsorption model. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 240, n. 1, p. 179-186, 2004.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.
- MAN-AHARONOVICH, D.; KRESS, N.; ZEEV, E.B.; BERMAN-FRANK, I.; BÉJÀ, O. Molecular ecology of *nifH* genes and transcripts in the eastern Mediterranean Sea. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 2354-63, 2007.
- MANGAN, S.; SCHNITZER, S.; HERRE, E.; MACK, K.M.L.; VALENCIA, M.C.; SANCHEZ, E.I.; BEYER, J.D. Negative plant-soil feedback predicts treespecies relative abundance in a tropical forest. **Nature**, London, v. 466, n. 7307, p. 752-755, 2010.
- MARDANOV, A.V.; GUMEROV, V.M.; BELETSKY, A.V.; PEREVALOVA, A.A.; KARPOV, G.A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; RAVIN, N.V. Uncultured archaea dominate in the thermal groundwater of Uzon Caldera, Kamchatka. **Extremophiles**, Tokyo, v. 15, n. 3, p. 365-372, 2011.
- MARKLEIN, A.R.; WINBOURNE, J.B.; ENDERS, S.K.; GONZALEZ, D.J.X.; VAN HUYSEN, T.L.; IZQUIERDO, J.E.; LIGHT, D.R.;

LIPTZIN, D.; MILLER, K.E.; MORFORD, S.L.; NORTON, R.A.; HOULTON, A.Z. Mineralization ratios of nitrogen and phosphorus from decomposing litter in temperate versus tropical forests. **Global Ecology and Biogeography**, Hoboken, v. 25, p. 335-346, 2016.

- MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 885-898, 2008.
- MARTINY, J.B.; BOHANNAN, B.J.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; OVREÅS, L.; REYSENBACH, A.L.; SMITH, V.H.; STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 102-12, 2006.
- MASON, O.U.; SCOTT, N.M.; GONZALEZ, A.; ROBBINS-PIANKA, A.; BAELUM, J.; KIMBREL, J.; JANSSON, J.K. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **ISME Journal**, London, v. 8, n. 7, p. 1464-1475, 2014.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOCCO, E.; YANO-MELO, A.M. (Eds.). Micologia: avanços no conhecimento. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2007. p. 129-140.
- MERON, D.; RODOLFO-METALPA, R.; CUNNING, R.; BAKER, A.C.; FINE, M.; BANIN, E. Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. **ISME Journal**, London, v. 6, n. 9, p. 1775-1785, 2012.
- MERTENS, J.; BROOS, K.; WAKELIN, S.A.; KOWALCHUK, G.A.; SPRINGAEL, D.; SMOLDERS, E. Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. **ISME Journal**, London, v. 3, p. 916-923, 2009.
- MEYER, D.; PAARMANN, M.; D'SOUZA, R.; OLSON, E.M.; GLASS, M.; KUBAL, T.; PACZIAN, A.; RODRIGUEZ, R.; STEVENS, A.; WILKE, J.; WILKENING, R.A. The metagenomics RAST server a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes.
  BMC Bioinformatics, Cambridge, v. 9, p. 386–388, 2008.
- MILLER, A.J. & CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, p. 1-36, 2004.
- MILLER, T.R.; DELCHER, A.L.; SALZBERG, S.L.; SAUNDERS, E.; DETTER, J.C.; HALDEN, R.U. Genome sequence of the dioxin-mineralizing bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. Journal of Bacteriology, Washington, v. 192, p. 6101-6102, 2010.
- MIYASHITA, N.T. Contrasting soil bacterial community structure between the phyla Acidobacteria and Proteobacteria in tropical Southeast Asian and temperate Japanese forests. **Genes & Genetic Systems**, v. 90, n. 2, p. 61-77, 2015.
- MOHAN, S.B.; SCHMID, M.; JETTEN, M.; COLE, J. Detection and widespread distribution of the nrfA gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 433-443, 2004.

- MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. (Ed.). Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology. John Wiley & Sons, 2013.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Editora UFLA, Lavras, 2006.
- MURO-PASTOR, M.L.; REYES, J.C.; FLORENCIO, F.J. Ammonium assimilation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.83, p.135-150, 2005.
- 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.
- NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETED, U. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist**, Hoboken, v. 182, p. 31-48, 2009.
- NAVARRETE, A.A.; KURAMAE, E.E.; HOLLANDER, M.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013.
- NEMERGUT, D.R.; CLEVELAND, C.C.; WIEDER, W.R.; WASHENBERGER, C.L. TOWNSEND, A.R. Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 42, p. 2153–2160, 2010.
- NICOL, G.W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? **Trends in Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 207–212, 2006.
- OLIVEIRA, I.A.; CAMPOS, M.C.C.; SOARES, M.D.R.; AQUINO, R.E.; MARQUES JUNIOR, J.; NASCIMENTO, E.D. Variabilidade espacial de atributos físicos em um Cambissolo Háplico, sob diferentes usos na região sul do Amazonas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v. 37, n. 4, p. 1103-1112, 2013.
- OPDYKE, M.R.; OSTROM, N.E.; OSTROM, P.H. Evidence for the predominance of denitrification as a source of N2O in temperate agricultural soils based on isotopologue measurements. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 23, p. 1-10, 2009.
- OTTO, R., FRANCO, H. C. J., FARONI, C. E., VITTI, A. C., DE OLIVEIRA, E. C. A., SERMARINI, R. A., TRIVELIN, P. C. O. The Role of Nitrogen Fertilizers in Sugarcane Root Biomass under Field Conditions. Agricultural Sciences, cidade, v. 5, n. 14, p. 1527, 2014.
- OTTO, R.; VITTI, G.C.; LUZ, P.H.C. Manejo da adubação potássica na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v. 34, p.1137-1145, 2010.
- PAL, R.R.; KRARDENAVIS, A.A.; PUROHIT, H.J. Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD-HP19-C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 15, p. 63-76, 2015.
- PARASHAR, K.S.; PRASAD, R.; SHARMA, R.P.; SHARMA, S.N.; SINGH, S.; Efficiency of urea, nitrification inhibitor treated urea and slow release

nitrogen fertilizers for sugarcane. **Zeitschrift für Pflanzenernäehrung und Bodenkunde**, v. 143, p. 262-267, 1980.

- PARKS, Donovan H.; BEIKO, Robert G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 715-721, 2010.
- PARRY, M.L., CANZIANI, O.F., PALUTIKOF, J.P., VAN DER LINDEN, P.J.; HANSEN, C.D. (Ed) Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, Editora Cambridge University, 2007. 976 p.
- PATERSON, A.H.; MOORE, P.H.; TEW, T.L. The gene pool of saccharum species and their improvement. In: Paterson A (ed) Genomics of the Saccharinae. Springer, Berlin, p. 43-72, 2013.
- PEREIRA E SILVA, M.C.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 57–68, 2011.
- PERRY, D. A.; AMARANTHUS, M. P.; BORCHERS, J. G.; BORCHERS, S. L.; BRAINERD, R. E. Bootstrapping in Ecosystems. Bioscience, Washington, v. 39, n. 4, p. 230-237, 1989.
- PETERSEN, D.G.; BLAZEWICZ, S.J.; FIRESTONE, M.; HERMAN, D.J.; TURETSKY, M.; WALDROP, M. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. **Environmental Microbiology**, Washington, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02679.x, 2012.
- PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and Archeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1577, p. 355–376, 2002.
- PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SCHLOTER, M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. **Advances in Agronomy**, New York, v. 96, p. 249-305, 2007.
- POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Netherlands, v. 152, 95-103, 2001.
- PRATSCHER, J.; DUMONT, M.G.; CONRAD, R. Ammonia oxidation coupled to CO2 fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 108, p. 4170–4175, 2011.
- PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 11, p. 2931-2941, 2008.
- QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; WEISSENBACH, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.
- RACHID, C.T.; PICCOLO, M.C.; LEITE, D.C.A.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.; VAN ELSAS, J.D.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under

differing sugarcane harvest management systems. **BMC Microbiology**, London, v.12, n. 170, p. 1-11, 2012.

- RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; GALLEGOS, M.T.; GODOY, P.; RAMOS-GONZALEZ, M.I.; ROJAS, A.; TERAN, W.; SEGURA, A. Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 56, p. 743-768, 2002.
- RAMPELOTTO, P.H.; DE SIQUEIRA FERREIRA, A.; BARBOZA, A.D.M.; ROESCH, L.F.W. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. **Microbial ecology**, New York, v. 66, n. 3, p. 593-607, 2013.
- RANJARD, L.; DEQUIEDT, S.; JOLIVET, C.; SABY, N.P.A.; THIOULOUSE, J.; HARMAND, J.; LOISEL, P.; RAPAPORT, A.; FALL, S.; SIMONET, P.; JOFFRE, R.; CHEMIDLIN-PRÉVOST BOURE, N.; MARON, P.A.; MOUGE, C.; MARTIN, M.P.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P. Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French national initiative. Agronomy for Sustainable Development, Paris, v. 30, p. 359–365, 2010.
- REIS, B.L.S.F.S.; MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; GARCIA, J.L.F. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. Biocombustíveis (BNDES Setorial), Rio de Janeiro, n. 35, p. 277-302, 2012.
- REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. Reitzer L Annual review of microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57p. 155-176, 2003.
- REMIGI, P.; ZHU, J.; YOUNG, J.P.W.; MASSON-BOIVIN, C. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. Trends in Microbiology, Kidlington, v. 24, p.63-75, 2016.
- RESENDE, A. S.; XAVIER, R. P.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; ALVES,
  B. J. R.; BODDEY, R. M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. Plant and Soil, Dordrecht, v. 281, n. 1-2, p. 339-351, 2006.
- ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e19045, 2011.
- ROESCH, L.; FULTHORPE, R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.; KENT,
   A.; DAROUB, S.; CAMARGO, F.;FARMERIE, W.; TRIPLETT, E. 2007.
   Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME
   Journal, London, v. 1, p. 283–290, 2007.
- ROTTHAUWE, J.; WITZEL, K.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.
- ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P.C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, London, v. 4, p. 1340-1351, 2010.
- ROUSSEL-DELIF, L.; TARNAWSKI, S.; HAMELIN, J.; PHILIPPOT, L.; ARAGNO, M.; FROMIN, N. Frequency and diversity of nitrate reductase

genes among nitrate-dissimilating Pseudomonas in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. **Microbial ecology**, New York, v. 49, n. 1, p. 63-72, 2005.

- RUDAZ, A.O.; WÄLTI, E.; KYBURZ, G.; LEHMANN, P.; FUHRER, J. Temporal variation in N 2 O and N 2 fluxes from a permanent pasture in Switzerland in relation to management, soil water content and soil temperature. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 73, n. 1, p. 83-91, 1999.
- RÜTTING, P.; BOECKX, C.; MÜLLER, L.; KLEMEDTSSON. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. **Biogeosciences**, Gottingen, v. 8, p. 1779-1791, 2011.
- SALLES, J.F.; LE ROUX, X.; POLY, F. Relating Phylogenetic and Functional Diversity among Denitrifiers and Quantifying their Capacity to Predict Community Functioning. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 209, 2012.
- SCHMIDT, T.M.; WALDRON, C. Microbial Diversity in Soils of Agricultural Landscapes and Its Relation to Ecosystem Function. In: **The Ecology of Agricultural Landscapes: Long-Term Research on the Path to Sustainability**, v. 135, 2015.
- SCHWARZ, H., LIEBHARD, P., EHRENDORFER, K., RUCKENBAUER, P. The effect of fertilization on yield and quality of Miscanthus sinensis 'Giganteus'. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 153-159, 1994.
- SENBAYRAM, M.; CHEN, R.; BUDAI, A.; BAKKEN, L.; DIITERT, K. N<sub>2</sub>O emission and the N<sub>2</sub>O/(N<sub>2</sub>O+ N<sub>2</sub>) product ratio of denitrification as controlled by available carbon substrates and nitrate concentrations. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 147, p. 4-12, 2012.
- SENBAYRAM, M.; CHEN, R.; MÜHLING, K.H.; DIITERT, K. Contribution of nitrification and denitrification to nitrous oxide emissions from soils after application of biogas waste and other fertilizers. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 16, p. 2489-2498, 2009.
- SHANGE, R.S.; ANKUMAH, R.O.; IBEKWE, A.M.; ZABAWA, R.; DOWD,S.E. Distinct soil bacterial communities revealed under a diversily managed agroecosystem, **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.7, e40338, 2012.
- SHAW, J.L.; MONIS, P.; FABRIS, R.; HO, L.; BRAUN, K.; DRIKAS, M.; COOPER, A. Assessing the impact of water treatment on bacterial biofilms in drinking water distribution systems using high-throughput DNA sequencing. **Chemosphere**, Oxford, v. 117, p. 185-192, 2014.
- SHEN, C.; XIONG, J.; ZHANG, H.; FENG, Y.; LIN, X.; CHU, H. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. Soil Biology and Biochemistry, Kidlington, v. 57, p. 204-211, 2013.
- SHI, W.; LU, W.; LIU, Q.; ZHI, Y.; ZHOU, P. The identification of the nitrate assimilation related genes in the novel *Bacillus megaterium* NCT-2 accounts for its ability to use nitrate as its only source of nitrogen. Functional and Integrative Genomics, Heidelberg, v. 14, p. 219-227, 2014.
- SHU, W.; PABLO, G.P.; JUN, Y.; DANFENG, H. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under

different duration of organic management. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, p. 493-503, 2012.

- SILVA, A.P.M.; BONO, J.A.M.; PEREIRA, F.A.R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental,** Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 38-43, 2014.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: **World congress on computers in agriculture**. 2009. p. 22-24. Volume 7.
- SILVA, R.B. da; LANÇAS, K.P.; MIRANDA, E.E.V.; SILVA, F.A.M.; BAIO, F.H.R. Estimation and evaluation of dynamic properties as indicators of changes on soil structure in sugarcane fields of Sao Paulo State – Brazil. Soil and Tillage Research, Amsterdam, v.103, p.265-270, 2009.
- SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genusspecific characterization by polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3278–3286, 1991.
- SINGH, B.K.; QUINCE, C.; MACDONALD, C.A.; KHACHANE, A.; THOMAS, N.; AL-SOUD, W.A.; CROOKS, B. Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. Environmental microbiology, Washington, v. 16, n. 8, p. 2408-2420, 2014.
- SINTES, E.; BERGAUER, K.; DE CORTE, D.; YOKOKAWA, T.; HERNDL, G.L. Archaeal amoA gene diversity points to distinct biogeography of ammonia-oxidizing Crenarchaeota in the ocean. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 15, p.1647-58, 2013.
- SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere." **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.
- STAPLES, C.R.; LAHIRI, S.; RAYMOND, J.; VON HERBULIS, L.; MUKHOPHADHYAY, B.; BLANKENSHIP, R.E. Expression and association of group IV nitrogenase NifD and NifH homologs in the nonnitrogen-fixing archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. Journal of Bacteriology, Washington, v. 189, p. 7392-7398, 2007.
- STARK, J.M. & HART, S.C. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. **Nature**, London, v. 385, p. 61-64, 1997.
- STEIN, L.Y.; KLOTZ, M.G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, Cambridge, v. 26, n. 3, p. R94-R98, 2016.
- STEWART, F.J.; ULLOA, O.; DeLONG, E.F. Microbial metatranscriptomics in a permanent marine oxygen minimum zone. **Environmental Microbiology,** Washington, v. 1, p. 23–40, 2011.
- SUN, W.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, M.; WANG, B. Characterization and identification of a chlorine-resistant bacterium, Sphingomonas TS001, from a model drinking water distribution system. Science of The Total Environment, Amsterdam, v. 458-460, p 169-175, 2013.
- SUZUKI, A.; KNAFF, D.B. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 83, p. 191-217, 2005.

- SUZUKI, A.; KNAFF, D.B. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 83, p. 191-217, 2005.
- SZUKICS, U.; HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; SESSITSCH,A. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 167, n. 2, p. 103-109, 2012.
- TANG, K.; JIAO, N.; LIU, K.; ZHANG, Y.; LI, S. Distribution and Functions of TonB-Dependent Transporters in Marine Bacteria and Environments: Implications for Dissolved Organic Matter Utilization. **PIoS One**, San Francisco, v. 7, p. e41204, 2012.
- TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. Canoco Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows. Centre for Biometry Wageningen: Wageningen, **The Netherlands**, 1998.
- THAMDRUP, B. New pathways and processes in the global nitrogen cycle. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, Palo Alto, v. 43, p. 407-428, 2012.
- THOMSON, B.C.; OSTLE, N.; McNAMARA, N.; BAILEY, M.; WHITELEY, A.S.; GRIFFITHS, R.I. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. **Microbial Ecology**, New York, v.59, v.2, p. 335-343, 2010.
- TIEDJE, J.M.; CHO, J.C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPEBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Org.). Sustainable management of soil organic matter. Wallingford: CAB International, 2001. p. 393-412.
- TREUSCH, A.H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S.C.; KLENK, H.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, n. 12, p. 1985-1995, 2005.
- UNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar (Setor Sucroenergético Mapa da Produção, 2016). Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em 03 maio 2016.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, Hoboken, v. 11, p. 296–31, 2008.
- VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TORSVIK, V.;HARTMANN, A.; TREVORS, J.T. (Ed.) **Modern Soil Microbiology II**, Boca Raton, Florida, Editora CRC, 2006. p. 83-106.
- VEGA-AVILA, A.D.; GUMIERE, T.; ANDRADE P.A.M.; LIMA-PERIM, J.E.; DURRER, A.; BAIGORI, M.; VAZQUEZ, F.; ANDREOTE, F.D. Bacterial communities in the rhizosphere of Vitis vinifera L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 575-588, 2015, 2015.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun

sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.

- VERHAMME, D.T.; PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Ammonia concentration determines 5 differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **ISME Journal**, London, v. 6, n. 5, p. 1067-1071, 2011.
- VIEIRA-MEGDA, M. X., MARIANO, E., LEITE, J. M., FRANCO, H. C. J., VITTI, A. C., MEGDA, M. M., TRIVELIN, P. C. O. Contribution of fertilizer nitrogen to the total nitrogen extracted by sugarcane under Brazilian field conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 101, n. 2, p. 241-257, 2015.
- VINALL, K. Use of inorganic and organic nitrogen sources by sugarcane. 2010. **Dissertação**. - The University of Queensland, St Lucia, Australia, 2010.
- VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C.; PENATTI, C.P.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; FRANCO, H.C.J. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. Pesquisa Agropecuária Brasileira, cidade, v.42, p.249-256, 2007.
- WAKELIN, S.A.; GUPTAC, V.V.S.R.; FORRESTER, S.T. Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N2-fixing bacteria in Australian agricultural soils. **Pedobiologia**, Jena, v. 53, n. 6, p. 391-399, 2010.
- WAKELIN, S.T.; COLLOFF, M.J.; HARVEY, P.R.; MARSCHNER, P.; GREGG, A.L.; ROGERS, S.L. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 661-670, 2007.
- WALLENSTEIN, M.D.; PETERJOHN, W.T.; SCHLESINGER, W.H. N fertilization effects on denitrification and N cycling in an aggrading forest. **Ecological Applications**, Washington, v. 16, p. 2168-2176, 2006.
- WALLIS, P.D.; HAYNES, R.J.; HUNTER, C.H.; MORRIS, C.D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 147-150, 2010.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.
   Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.
- ZEHR, J.P., JENKINS, B.D., SHORT, S.M., AND STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a crosssystem comparison. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 539-554, 2003.
- ZEHR, J.P.; KUDELA, R.M. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. **Annual review of marine science**, Palo Alto, v. 3, p. 197-225, 2011.
- ZHANG, Y.M.; WANG, H.L.; WANG, X.Q. The microstructure of microbiotic crust and its influence on wind erosion for a sandy soil surface in the Gurbantunggut desert of Northwestern China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 132, p. 441–449, 2006.
- ZHAO, J.; ZENG, Z.; HE, X.; CHEN, H.; WANG, K. Effects of monoculture

and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 68, p. 61-68, 2015.

- ŽIFČÁKOVÁ, L.; VĚTROVSKÝ, T.; HOWE, A.; BALDRIAN, P. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. **Environmental microbiology**, Washington, v. 18, n. 1, p. 288-301, 2016.
- ZUMFT, W. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology** and **Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, p. 533-616, 1997.

ANEXOS

Amostra	рН CaCl <sub>2</sub>	mg dm <sup>-3</sup>	<b>ہ</b>	Ca <sup>3</sup>	Mg <sup>4</sup>	H+AI <sup>5</sup> mol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	SB	СТС	» <	° 7	<sup>7</sup> MO <sup>8</sup>	7 MO <sup>8</sup> Areia
A1	5,55	61	15,5	61	22	34,5	98,5	133		73,5	73,5 34	73,5 34 17,3
A2	5,55	25,5	12,4	58,5	20	34	90,9	124,9		72,5	72,5 35	72,5 35 14,3
A3	5,35	42	9,5	52	18,5	34,5	80	114,5		69,5	69,5 32	69,5 32 7,6
Α4	4,95	9	3,45	31,5	12	42	46,95	88,95		53	53 28	53 28 15,3
A5	5,25	29	8,35	45,5	17	40,5	70,85	111,35		64	64 32,5	64 32,5 13,5
A6	4,95	146	17,2	54,5	18,5	49,5	90,2	139,7		64,5	64,5 35	64,5 35 7,4
A7	5,25	46,5	14,9	55,5	19	40,5	89,4	129,9		68,5	68,5 32,5	68,5 32,5 5,0
A8	5,4	166	15,25	66	20	36	101,25	137,25	•	73,5	73,5 37	; 73,5 37 13,3
A9	5,25	79	11,1	50,5	20	44,5	81,6	126,1		64,5	64,5 29,5	64,5 29,5 11,4
A10	4,65	თ	1,55	17,5	6,5	34	25,55	59,55		42,5	42,5 17,5	42,5 17,5 79,7
F1	5,45	28	5,9	43,5	13,5	31	62,9	93,9		65	65 21	65 21 48,7
F2	5,7	33,5	7,3	47,5	13	28	67,8	95,8		70,5	70,5 25,5	70,5 25,5 49,4
F3	5,15	20	4	25	7	24	36	60		59,5	59,5 16	59,5 16 79,2
F4	5,7	25	6,8	37,5	12,5	27	56,8	83,8		69	69 22	69 22 59,3
F5	5,3	20	5,8	29	9,5	33	44,3	77,3		55,5	55,5 21	55,5 21 52,8
F6	4,95	15,5	212	14		38	23,75	61,75		38,5	38,5 20	38,5 20 47,3
ósforo; <sup>2</sup> Po	tássio: <sup>3</sup> Cá	lcio: <sup>4</sup> Magné	1,10	- 4- 0,	6,5		•			ra. 'Satiirar	ra. (Saturação nor ha	ca: <sup>7</sup> Saturacão nor hases <sup>, 8</sup> Matéria

Anexo A – Características físico-químicas dos solos das áreas

	рН	P1	K <sup>2</sup>	Са <sup>3</sup>	$Mg^4$	H+Al <sup>5</sup>	SB	стс	V <sup>7</sup>	MO <sup>8</sup>	Areia	Silte
Amostra	CaCl	mg dm <sup>-3</sup>			mm	iol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			%	g dm <sup>-3</sup>		
F7	4,95	28	3,85	25	11	38,5	39,85	78,35	52,5	24	51,1	9,
F8	5,35	37	5,65	33	12	33,5	50,65	84,15	53,5	25,5	54,3	,e
F9	5,35	37	5,65	33	12	33,5	50,65	84,15	53,5	25,5	54,6	,e
F10	5,35	36	2,7	30	9	26	41,7	67,7	62,5	18,5	69,2	4
J1	5,6	53	1,7	36,5	11,5	20	49,7	69,7	71,5	25,5	71,2	з,
J2	4,85	40	1,25	19,5	5,5	20	26,25	46,25	56,5	15,5	81,0	,Ω
J3	5,7	38,5	6,0	42	7	15,5	49,9	65,4	76	18,5	73,2	4
J4	ភ ភូ	4,5	5,75	35	8,5	18	49,25	67,25	73	20,5	73,7	ω
J5	5,2	13	2,05	24,5	GI	21	31,55	52,55	60	18,5	70,2	4
9C	თ	23	7,3	45	11	14	63,3	77,3	81,5	23,5	73,0	ω
J7	4,65	8,5	4,6	12	Сı	25	21,6	46,6	46	14	71,7	ω
8L	5,1	1,5	0,65	16	GI	17	21,65	38,65	56,5	10,5	75,5	ω
6ſ	<b>б</b>	30	5,45	41	10	13	56,45	69,45	81,5	18	71,6	ω
. 110	сл ,00	18	, Ъ	22,5	ი	14	30	44	89	11,5	80,3	Ņ

Anexo A – Características físico-químicas dos solos das áreas

Anexo B –	Quantificação	de amé	ônio (	$(N-NH_4^+)$	e de	e nitrato	(N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	nos	solos
	amostrados								

Ároa	Amostra	$N-NH_4^+$	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Alea	Amostra	mg N/l	kg solo
	A1	10,6	15,9
	A2	9,9	10,4
	A3	12,5	19,9
	A4	12,2	17,8
Ároa A	A5	9,1	9,4
Alea A	A6	9,9	8,2
	A7	10,4	8,6
	A8	10,6	10,3
	A9	13,3	18,0
	A10	10,6	10,3
	F1	6,2	9,9
	F2	6,7	11,3
	F3	7,2	13,0
	F4	6,9	10,4
Ároa E	F5	6,3	11,8
Alear	F6	7,8	9,8
	F7	9,7	10,2
	F8	8,1	9,3
	F9	7,9	14,4
	F10	7,4	11,9
	J1	10,1	16,1
	J2	9,5	14,3
	J3	9,9	17,5
	J4	9,0	16,6
Área I	J5	8,6	13,6
Alea J	J6	11,0	19,8
	J7	12,0	12,4
	J8	11,4	11,7
	J9	12,6	17,2
	J10	9,2	12,0

<sup>1</sup> TCC – Te <sup>7</sup> QC – Que	A12I	A11III	A11I	A10III	A10I	A9II	A9I	A8II	A8I	A7I	A7II	A6II	A6I	A5II	A5III	A4II	A4V	A3V	A3III	A2I	A2III	A1III	A1II		Amostra	Anexo C
eima da c	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	ω	ω	10	10	10	10	anos	TCC <sup>1</sup>	Ĭ
ultivo de ana; <sup>8</sup> Pro	Sim	- 14		Atributo																						
cana; <sup>2</sup> F dut – Prc	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	• • • •	Vin <sup>3</sup>	os de ent									
ertilizaça	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	=	TE <sup>4</sup>	revista c									
ăo minera de (tonela	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	5	<b>C &gt;</b> <sup>5</sup>	om os pro							
l; <sup>3</sup> Vin – Vir adas por he	Sim		СМ <sup>е</sup>	odutores da																						
haça; <sup>4</sup> TF - ctare); <sup>9</sup> T -	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	ç		as áreas													
<ul> <li>Torta de filtr</li> <li>Temperatura</li> </ul>	94	76	76	76	76	118	118	118	118	93	93	123	123	76	76	72	72	127	127	06	06	118	118	to/ha	Produt <sup>8</sup>	
o; <sup>5</sup> CA – Carv (Celsius)	23	21	21	21	21	20	20	20	20	21	21	26	26	26	26	23	23	26,5	26,5	29,5	29,5	32	32	Celsius	Т <sup>9</sup>	
ão ativado; <sup>6</sup> CM –	50°33'20,0"W	50°25'08,3"W	50°25'06,3"W	50°24'21,0"W	50°24'19,0"W	50°31'16,0"W	50°31'14,0"W	50°32'24,0"W	50°32'22,0"W	50°43'25,0"W	50°43'23,0"W	50°33'25,0"W	50°33'23,0"W	50°38'14,3"W	50°38'12,3"W	50°40'44,0"W	50°40'46,0"W	50°32'56,0"W	50°32'57,0"W	50°33'58,0"W	50°33'59,0"W	50°33'26,0"W	50°33'24,0"W	0	Latitude	
Colheita mecanizada;	22°43'50,0"S	22°37'07,0"S	22°37'10,0"S	22°37'26,0"S	22°37'29,0"S	22°48'27,0"S	22°48'31,0"S	22°48'28,0"S	22°48'31,0"S	22°52'59,0"S	22°53'00,0"S	22°49'59,0"S	22°50'00,0"S	22°51'56,7"S	22°51'58,7"S	22°45'33,0"S	22°45'35,0"S	22°45'37,0"S	22°45'35,0"S	22°45'53,0"S	22°45'49,0"S	22°46'06,8"S	22°46'10,8"S	raus	Longitude	(Continuação)

TCC – Tempo di	F4III 20	F4I 20	F3II 10	F3I 10	F2II 10	F2I 10	F1IV 40	F1III 40	A18III 0	A18I 0	A17III 10	A17II 10	A16I 10	A16II 10	A15II 10	A15I 10	A14II 10	A14V 10	A13I 10	A13III 10	A12III 10	Allostia ano.	Amostra TCC	Anexo C –
e cultivo de	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	S		Atributo														
cana; <sup>z</sup> Fer	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim		Vin <sup>3</sup>	s de entre													
tilização	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	=	TE4	vista cor														
mineral;	Não	Sim	Sim	Não	5	C \ 5	n os prod																	
<sup>3</sup> Vin – Vinhaç	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim		CMe	utores das ar														
;a; <sup>4</sup> TF – 1 - <sup>9</sup> T – 1	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	ć		eas
Torta de filtro; <sup>5</sup>	100	100	75	75	75	75	80	80	78	78	55	55	127	127	58	58	93	93	156	156	94	to/ha	Produt <sup>8</sup>	
CA – Carvão	26	26	29	29	26	26	24	24	23	23	21	21	24	24	20	20	23	23	24	24	23	Celsius	Р.	
) ativado; <sup>6</sup> CM – Cc	48°02'40,0"W	48°02'38,0"W	48°01'41,0"W	48°01'38,0"W	48°05'50,0"W	48°05'49,0"W	48°05'32,0"W	48°05'30,0"W	50°16'38,0"W	50°16'36,0"W	50°17'50,0"W	50°17'48,0"W	50°22'47,0"W	50°22'44,0"W	50°30'04,0"W	50°30'01,0"W	50°33'12,0"W	50°33'09,0"W	50°32'43,0"W	50°32'41,0"W	50°33'23,0"W	Gri	Latitude	
olheita mecanizada;	21°47'51,0"S	21°47'53,0"S	21°44'37,0"S	21°44'39,0"S	21°44'35,0"S	21°44'39,0"S	21°45'01,0"S	21°45'05,0"S	22°37'43,0"S	22°37'45,0"S	22°42'49,0"S	22°42'51,0"S	22°49'12,0"S	22°49'14,0"S	22°51'48,0"S	22°51'51,0"S	22°39'23,0"S	22°39'27,0"S	22°40'43,0"S	22°40'46,0"S	22°43'47,0"S	aus	Longitude	(Continuação)

Sim Sim Sim Sim Sim Sim Não Não Não Não	Não Não Não Não Não Não Não	sim Sim Sim Sim Sim	Não Sim Não Sim Sim		65 50 88 88 00 55 55 56 70 88 88 00 55 55 55 55 55 55 55 55 55 55 55 55	65 65 65 65 65 65 65 65 65 65 65 65 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80 80	100         27         48°02'02,0"W           100         27         48°03'54,0"W           65         32         48°03'56,0"W           65         32         48°03'56,0"W           65         34         47°47'46,4"W           65         34         47°47'49,4"W           100         35         47°48'06,6"W           80         28         49°57'25,6"W           80         28         49°57'52,2"W           80         25         49°57'52,2"W           80         25         49°57'54,2"W           50         31         49°56'34,2"W           50         31         49°56'34,2"W           50         31         49°56'34,2"W
Sim Sim Sim Sim Sim Sim Não Não Não	<ul> <li>N 2 4 5 0</li> <li>N 2 4</li></ul>	Sim Sim Sim Sim Sim	Não Não Não Não Não Não			3 3 2 2 8 8 8 4 4 2 2 7 <sup>6</sup> 3 3 6 2 8 8	27       48°02'02,0"W         32       48°03'54,0"W         32       48°03'56,0"W         34       47°47'46,4"W         35       47°47'49,4"W         36       47°47'49,4"W         28       49°57'25,6"W         28       49°57'52,2"W         25       49°57'52,2"W         31       49°56'32,2"W         31       49°56'32,2"W
Sim Sim Sim Sim Sim Sim Sim Sim Sim Sim	Não Não Não Não Não	Sim Sim Sim	Não Não Não Não	5 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8		2 2 2 8 8 8 3 4 4 8 2 7 <sup>4</sup>	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W 35 47°47'49,4"W 35 47°47'49,4"W 28 49°57'25,6"W 28 49°57'52,6"W 25 49°57'54,2"W
Sim Sim Sim Sim Sim Sim Não Não	<ul> <li>N 2 道の</li> </ul>	Sim Sim Sim Sim	Não Não Não Não	100 65 80 80		22 28 33 34 32 32 <sup>5</sup> 25 28 35 34 34 32 32 <sup>5</sup>	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 34 47°47'46,4"W 35 47°47'49,4"W 35 47°47'49,4"W 28 49°57'25,6"W 28 49°57'27,6"W 25 49°57'52,2"W
Sim Sim Sim Sim Sim Sim Sim	<ul> <li>N 2 あの</li> </ul>	Sim Sim Sim Sim	Não Não Não	100 80		28 28 28 28	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W 35 47°47'49,4"W 28 49°57'25,6"W 28 49°57'27,6"W
Sim	Não Não Não	Sim Sim Sim	Não Não Não	100 65 65 80		28 35 34 32 27 5	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W 34 47°47'49,4"W 35 47°48'06,6"W 28 49°57'25,6"W
Sim Sim Sim Sim	Não Não Não	Sim Sim Sim	Não Sim Não	100 65 65		34 34 35	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W 34 47°47'49,4"W 35 47°48'06,6"W
Sim Sim Sim	<ul> <li>Não</li> <li>Não</li> <li>Não</li> </ul>	Sim Sim Sim	Não Sim	100 65 65		34 34 34	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W 34 47°47'49,4"W
Sim Sim Sim	Não Não Não	Sim Sim	Não Sim	100 65 65		27 32 34	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W 34 47°47'46,4"W
Sim Sim	Não Não Não	Sim Sim	N Não Não O	100 65		27 32 32	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W 32 48°03'56,0"W
Sim Sim	Não Não	Sim Sim	Não	100 65		27 32	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W 32 48°03'54,0"W
Sim Sim	Não Não	Sim	Não	100		27	27 48°02'02,0"W 27 48°02'04,0"W
Sim	Não	Sim	INCO			7	27 48°02'02,0"W
Sim			N30	100		97	
	Não	Não	Sim	80		36	36 48°03'26,0"W
Sim	Não	Não	Sim	80		36	36 48°03'24,0"W
Sim	Não	Não	Não	45		30	30 48°02'26,0"W
Sim	Não	Não	Não	45		30	30 48°02'24,0"W
Sim	Não	Não	Sim	100		25	25 48°02'54,0"W
Sim	Não	Não	Sim	100		25	25 48°02'52,0"W
Sim	Não	Não	Sim	85		30	30 48°01'54,0"W
Sim	Não	Não	Sim	85		30	30 48°01'52,0"W
=	Ĵ	CIN	Ę	to/ha		Celsius	Celsius Gra
<b>- - 4</b>	<b>^</b> ^ 5	<b>C</b> M9	<b>00</b> <sup>7</sup>	Produt	œ	е <b>т</b> 8	<sup>8</sup> T <sup>9</sup> Latitude
	Sim	TF <sup>4</sup> CA <sup>5</sup> Sim Não Sim Não Sim Não Sim Não Sim Não Sim Não Sim Não Sim Não	TF <sup>4</sup> CA <sup>5</sup> CM <sup>6</sup> Sim       Não       Não         Sim       Não       Não	TF <sup>4</sup> CA <sup>5</sup> CM <sup>6</sup> QC <sup>7</sup> Sim     Não     Não     Sim       Sim     Não     Não     Não       Sim     Não     Não     Não       Sim     Não     Não     Sim       Sim     Não     Não     Sim       Sim     Não     Não     Sim       Sim     Não     Não     Sim       Sim     Não     Não     Sim	wista com os produtores das áreas       TF <sup>4</sup> CA <sup>5</sup> CM <sup>6</sup> QC <sup>7</sup> Produt <sup>®</sup> Sim     Não     Não     Sim     85       Sim     Não     Não     Sim     85       Sim     Não     Não     Sim     85       Sim     Não     Não     Sim     100       Sim     Não     Não     Sim     100       Sim     Não     Não     Sim     45       Sim     Não     Não     Sim     80       Sim     Não     Não     Sim     80	wista com os produtores das áreasTF*CA5CM6QC7Produt8T9SimNãoNãoSim8530SimNãoNãoSim8530SimNãoNãoSim10025SimNãoNãoNão4530SimNãoNãoNão4530SimNãoNãoNão4530SimNãoNãoSim10025SimNãoNãoNão4530SimNãoNãoSim8036SimNãoNãoSim8036	vista com os produtores das áreas           TF <sup>4</sup> CA <sup>5</sup> CM <sup>6</sup> QC <sup>7</sup> Produt <sup>8</sup> T <sup>9</sup> Latitude           Sim         Não         Não         Sim         85         30         48°01'52,0"W           Sim         Não         Não         Sim         85         30         48°01'52,0"W           Sim         Não         Não         Sim         85         30         48°01'52,0"W           Sim         Não         Não         Sim         100         25         48°02'52,0"W           Sim         Não         Não         Não         45         30         48°02'54,0"W           Sim         Não         Não         Não         45         30         48°03'24,0"W           Sim         Não         Não         Sim         80         36         48°03'26,0"W

106

Atributos de entrevista com os produtores das áreas
Anexo C -	I	Atributos	de entre	vista con	n os prod	utores das ár	eas				(Conclusão)
Amonten	TCC1	<b>E</b> M2	1/1-3	<b>+-</b> 4	C > 5	<b>6</b>	<b>~~</b> <sup>7</sup>	Produt <sup>8</sup>	₽ <sup>9</sup>	Latitude	Longitude
Amostra	anos		VIII	-	CA		ų,	to/ha	Celsius	Gra	IUS
J4I	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	60	28	49°55'31,4"W	20°55'59,0"S
J5I	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	80	28	49°55'04,9"W	20°55'60,0"S
JSII	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	80	28	49°55'07,9"W	20°55'57,0"S
J6III	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	80	27	49°55'04,8"W	20°56'01,4"S
AI9f	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	80	27	49°55'06,8"W	20°56'00,4"S
J7IV	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	85	31	49°54'12,5"W	20°55'14,1"S
J7I	10	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	85	31	49°54'15,5"W	20°55'11,1"S
J8II	GI	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	32	49°54'21,0"W	20°54'57,0"S
<b>NI8</b>	σı	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	32	49°54'23,0"W	20°54'56,0"S
AIGC	GI	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	26	49°54'33,1"W	20°56'40,1"S
III6C	GI	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	26	49°54'36,1"W	20°56'37,1"S
J1011	σı	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	35	49°55'13,3"W	20°58'39,5"S
J10IV	5	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	70	35	49°55'16,3"W	20°58'37,5"S
	ipo de ci	ultivo de ca	ina; <sup>z</sup> Fer	tilização	mineral;	<sup>3</sup> Vin – Vinhaç	a; <sup>4</sup> TF	Forta de filtro; <sup>5</sup> C	CA – Carvão	ativado; <sup>6</sup> CM – Col	Iheita mecanizada;
	3 2 2 2 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3				10000						

Q	-
ဂ	5
1	ì
õ	<u> </u>
P	Φ
3	Ę
ā	8
ő	Q
2	n n
ğ	2
ы П	₫
<u> </u>	₀§
Ţ	۵
ğ.	ወ
E	പ്പ
Ť	ž
÷	بو
ੜੱ	-
a	Щ
듚	≣
≤.	N
g	Ş,
ã	ao
CD O	5
ਰਿ	Ę
ž	ดี
8	പ
ã	
as	<
σ	Б
9	I
۲	$\leq$
g	P
đ	ഖ
e	ŝ
	യ
<u> </u>	<u>a</u>
); T	н Э
); T	а; - т , ;е
); "T – T	а; Т Г
); <sup>"</sup> T – Ten	a;
); <sup>"</sup> T – Temp	a;
); <sup>খ</sup> T – Temper	a;
); <sup>খ</sup> T – Temperat	a; 🤆 I - I orta de
); <sup>খ</sup> T – Temperatur	a; ji F – Torta de fil
); <sup>®</sup> T – Temperatura	a; TH – Forta de filtro
); <sup>ッ</sup> T – Temperatura (C	a; IF – Forta de filtro;
); <sup>খ</sup> T – Temperatura (Cel:	a; [IF – I orta de filtro; [C
); <sup>ッ</sup> T – Temperatura (Celsiu	a; [IF – I orta de filtro; "CA
); <sup>®</sup> T – Temperatura (Celsius	a; [IF – I orta de filtro; [CA –
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – I orta de filtro; [CA – Ca
); <sup>খ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Car
); <sup>খ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carva
); <sup>খ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; [CA – Carvao
); <sup>ÿ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao at
); <sup>ÿ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a;  [IF – I orta de filtro; CA – Carvao ativa
); <sup>ÿ</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativad
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; [CA – Carvao ativado;
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – I orta de filtro; [CA – Carvao ativado; [C
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CN
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; [CA – Carvao ativado; [CM -
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – I orta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – C
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Co
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Colhi
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Colheit
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; TF – Forta de filtro; TCA – Carvao ativado; TCM – Colheita
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; TF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Colheita m
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a;  [IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Colheita mec
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; "IF – Forta de filtro; "CA – Carvao ativado; "CM – Colheita mecal
); <sup>s</sup> T – Temperatura (Celsius)	a; TF – Torta de filtro; TCA – Carvao ativado; TCM – Colheita mecaniz

Área	Amostra	Nome da
	composta	amostra
	ID01	A8I
	JFUT	A8II
Ároa A		A10I
Alea A	JF02	A10III
	1002	A14II
	JF03	A14V
	1004	F2I
	JP04	F2II
Áraa E	IDOE	F3I
Alear	JF05	F3II
	IDOG	F7II
	JF00	F7IV
	1007	J3III
	JF07	J3IV
Áraa I	IDUS	J8II
Alta J	JFUO	J8IV
	IPOO	J10II
	JFU9	J10IV

Anexo D – Amostras de solo (individuais e agrupadas) utilizadas para obtenção das sequências por metagenoma *shotgun* e *amplicon* do gene 16S rDNA

<sup>1</sup> Número identifi			יין מסיר	Áraa Ao								יד מסור	Áraa A1						Metagenoma	
icador do arquivo dentro do banco de dados;	JP02A_index2_CGATGT_L002_R2_001	Total (R1)	JP02A_index2_CGATGT_L002_R1_004	JP02A_index2_CGATGT_L002_R1_003	JP02A_index2_CGATGT_L002_R1_002	JP02A_index2_CGATGT_L002_R1_001	Total (R2)	JP01A_index1_ATCACG_L002_R2_005	JP01A_index1_ATCACG_L002_R2_004	JP01A_index1_ATCACG_L002_R2_003	JP01A_index1_ATCACG_L002_R2_002	JP01A_index1_ATCACG_L002_R2_001	Total (R1)	JP01A_index1_ATCACG_L002_R1_005	JP01A_index1_ATCACG_L002_R1_004	JP01A_index1_ATCACG_L002_R1_003	JP01A_index1_ATCACG_L002_R1_002	JP01A_index1_ATCACG_L002_R1_001	a Dataset	
<sup>2</sup> Predicted Protei	4581427.3		4581426.3	4581425.3	4581424.3	4581423.3		4581422.3	4581421.3	4581420.3	4581419.3	4581418.3		4581417.3	4581416.3	4581415.3	4581414.3	4581413.3	MG-RAST ID <sup>1</sup>	
in Features; <sup>3</sup> Prediu	532743741	2173962846	491668663	565018725	554333697	562941761	2355436313	234377271	527145521	531697185	528947757	533268579	2478644552	247702352	559328562	558963823	551244025	561405790	Bp count	
cted rRNA Feature	3744114	14760295	3396716	3887225	3597947	3878407	16649828	1659427	3748624	3754343	3735102	3752332	17153781	1716375	3872417	3862379	3829697	3872913	Sequences count	
s; <sup>₄</sup> ldentifiea؛	3456826	14035922	3173450	3638153	3597947	3626372	15386285	1537356	3461594	3472408	3445287	3469640	16062731	1609217	3619876	3616850	3592314	3624474	PPF <sup>2*</sup>	
l Protein Fe	36519	140340	31629	35647	37400	35664	168905	17105	38279	37769	38288	37464	149462	1641	36872	36514	37946	36489	PrRF <sup>3*</sup>	
atures; <sup>5</sup> lden;	1155464	4703843	1067242	1233875	1173143	1229583	5202755	520938	1155341	1172057	1170426	1183993	4988473	55589	1240473	1239605	1194671	1258135	IPF <sup>4*</sup>	
tified rRNA	691	3028	657	796	842	733	2739	282	635	585	610	627	3055	308	680	663	729	675	IrRF <sup>5*</sup>	(Con
Features;	903506	3677481	834535	965105	916266	961575	4110889	412192	912806	925195	924487	936209	4337406	439719	980067	979547	943251	994822	IFC <sup>6*</sup>	tinuação)

<sup>o</sup>Identified Functional Categories Dataset = nome do arquivo no MG-RAST; *Bp count* = valores de pares de base; *Sequences count* = valores de sequências \*Pós controle de qualidade

<sup>1</sup> Número identifica		Área F1							Liea 13	6 V COJ Y									Área A2		
dor do arquivo dentro do banco de dados; pal Categorias	JP04A_index4_TGACCA_L002_R1_003	JP04A_index4_TGACCA_L002_R1_002	JP04A_index4_TGACCA_L002_R1_001	Total (R2)	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R2_005	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R2_004	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R2_003	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R2_002	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R2_001	Total (R1)	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R1_005	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R1_004	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R1_003	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R1_002	JP03A_index3_TTAGGC_L002_R1_001	Total (R2)	JP02A_index2_CGATGT_L002_R2_004	JP02A_index2_CGATGT_L002_R2_003	JP02A_index2_CGATGT_L002_R2_002	Dataset	
<sup>2</sup> Predicted Protei	4581443.3	4581442.3	4581441.3		4581440.3	4581439.3	4581438.3	4581437.3	4581436.3		4581435.3	4581434.3	4581433.3	4581432.3	4581431.3		4581430.3	4581429.3	4581428.3	MG-RAST ID <sup>1</sup>	
in Features; <sup>3</sup> Predi	559059375	551042872	561101287	2337545937	234600437	522686602	527619211	524096211	528543476	2477195655	249417998	558707331	557988343	550497682	560584301	2055471721	460908260	533115669	528704051	Bp count	
cted rRNA Feature	3864303	3831011	3873674	16599458	1667834	3733768	3741019	3719464	3737373	17167667	1731007	3872631	3861222	3830166	3872641	14497548	3271633	3755964	3725837	Sequences count	
∍s; <sup>4</sup> ldentifiec	3616942	3591218	3623667	15214333	1533639	3419716	3432874	3402258	3425846	15984900	1613938	3599004	3594883	3573885	3603190	13382516	3018457	3472967	3434266	PPF <sup>2*</sup>	
l Protein Fe	38913	40478	39049	158432	1772	39608	39026	39334	38692	169776	17269	37942	37706	39135	37724	143467	32842	37114	36992	PrRF <sup>3*</sup>	
eatures; <sup>5</sup> lder	1313575	1261633	1327048	5192308	524693	1150581	1170434	1167551	1179049	5531234	564826	1248268	1248552	1205534	1264054	4434811	987417	1147926	1144004	IPF⁴*	
tified rRN <i>i</i>	886	893	844	2937	309	669	635	702	622	3190	340	710	677	761	702	2768	628	721	728	IrRF <sup>5*</sup>	(Cor
<i>Y Features;</i>	1029842	987855	1040272	3248174	410563	89897	914846	912432	920436	4320426	442161	974509	975655	941254	986847	3467464	771853	897303	894802	IFC <sup>6*</sup>	ıtinuação)

Dataset = nome do arquivo no MG-RAST; Bp count = valores de pares de base; Sequences count = valores de sequências \*Pós controle de qualidade

								(Cor	itinua
	Dataset	MG-RAST ID <sup>1</sup>	Bp count	Sequences count	PPF <sup>2*</sup>	PrRF <sup>3*</sup>	IPF⁴*	IrRF <sup>5*</sup>	
ب	P04A_index4_TGACCA_L002_R1_004	4581444.3	559005285	3873339	3619722	39184	1309815	860	102
Ļ	P04A_index4_TGACCA_L002_R1_005	4581445.3	220142680	1525636	1430309	15662	523213	371	4
Área F1	Total (R1)		2450351499	16967963	15881858	173286	5735284	3854	4
Ļ	P04A_index4_TGACCA_L002_R2_001	4581446.3	532130558	3751797	3465457	40577	1246428	844	97
Ļ	P04A_index4_TGACCA_L002_R2_002	4581447.3	527381106	3732487	3438286	40262	1232308	840	96
Ļ	P04A_index4_TGACCA_L002_R2_003	4581448.3	530996694	3755013	3470675	40228	1239985	865	9
Ļ	P04A_index4_TGACCA_L002_R2_004	4581449.3	525865755	3747594	3457350	40938	1215127	816	95
	Total (R2)		2116374113	14986891	13831768	162005	4933848	3365	20
J	P05A_index5_ACAGTG_L002_R1_001	4581451.3	561537507	3874233	3619462	38127	1326379	984	103
Ļ	P05A_index5_ACAGTG_L002_R1_002	4581452.3	551992463	3831177	3587048	39384	1260254	951	980
Ļ	P05A_index5_ACAGTG_L002_R1_003	4581453.3	561177360	3871763	3619003	3824	1316668	954	102
Ļ	P05A_index5_ACAGTG_L002_R1_005	4581455.3	131004291	908171	848831	9271	310128	248	24
	Total (R1)		2365555732	16359548	15290456	128708	5523174	4061	40
Área F2 Ji	P05A_index5_ACAGTG_L002_R2_001	4581456.3	533808044	3754984	3467071	39154	1252085	938	97
ب	P05A_index5_ACAGTG_L002_R2_002	4581457.3	529431435	3737540	3442512	39288	1236820	866	96
Ļ	P05A_index5_ACAGTG_L002_R2_003	4581458.3	533260694	3761951	3475052	39711	1242207	949	97(
Ļ	P05A_index5_ACAGTG_L002_R2_004	4581459.3	528035300	3752565	3460115	44049	1220352	2708	95
ب	P05A_index5_ACAGTG_L002_R2_005	4581460.3	123988347	878107	81158	9466	277993	238	21
	Total (R2)		2248523820	15885147	13925908	171668	5229457	5699	40
	Total (R2)		2248523820	15885147	13925908	17166	8	68 5229457	68 5229457 5699

Dataset = nome do arquivo no MG-RAST; Bp count = valores de pares de base; Sequences count = valores de sequências \*Pós controle de qualidade

<sup>1</sup> Número ider. <sup>6</sup> Identified Fu				Área J1											Área F3					
ntificador do arquivo dentro do banco de dados; nctional Categories	JP07A_index7_CAGATC_L002_R2_002	JP07A_index7_CAGATC_L002_R2_001	Total (R1)	JP07A_index7_CAGATC_L002_R1_004	JP07A_index7_CAGATC_L002_R1_003	JP07A_index7_CAGATC_L002_R1_002	JP07A_index7_CAGATC_L002_R1_001	Total (R2)	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R2_005	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R2_004	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R2_003	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R2_002	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R2_001	Total (R1)	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R1_005	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R1_004	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R1_003	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R1_002	JP06A_index6_GCCAAT_L002_R1_001	Dataset
<sup>2</sup> Predicted Prote	4581476.3	4581475.3		4581474.3	4581473.3	4581472.3	4581471.3		4581470.3	4581469.3	4581468.3	4581467.3	4581466.3		4581465.3	4581464.3	4581463.3	4581462.3	4581461.3	MG-RAST ID <sup>1</sup>
9in Features; <sup>3</sup> Predi	534531961	538000559	4707715447	524118673	563527975	551694911	561405965	2506967923	398066378	526209259	526335249	526325078	530031959	2653936401	425206875	559404886	555860217	552274342	561190081	Bp count
cted rRNA Featur	3758593	3773583	32991278	3626154	3882547	3828910	3874110	17779557	2839826	3739721	3731945	3726614	3741451	18382231	2947292	3872724	3850746	3837200	3874269	Sequences count
es; <sup>4</sup> Identifiec	3453413	3474327	30499934	3369182	3613780	3576964	3601891	16338117	2609969	3436482	3429980	3420713	3440973	17145469	2747211	3606655	3592157	3587294	3612152	PPF <sup>2*</sup>
l Protein Fi	36664	36421	294083	33462	35429	37238	35385	152569	30543	39556	3941	39151	39378	181903	29326	37941	38132	38778	37726	PrRF <sup>3*</sup>
eatures; <sup>5</sup> lder,	1195598	1207968	10707891	1177296	1271050	1211319	1268187	5780039	914539	1209322	1212106	1216272	1227800	6140117	90006	1300804	1280804	1256589	1311914	IPF4*
ntified rRN,	694	707	6685	687	723	739	722	3814	610	817	759	789	839	4142	683	840	888	882	849	IrRF <sup>5*</sup>
4 Features;	935387	942606	8396745	919756	993293	946221	990545	4546930	719216	951289	953801	957388	965236	4828347	778758	1022589	1007006	987576	1032418	IFC <sup>6*</sup>

Internition Conceptional Conceptional Conception Conceptina Conception Conception Conception Conceptina Conceptina Conc

112

(Continuação)

<sup>1</sup> Número identif			רו המ יו	Áron 12							rita J2	áron 10									
ficador do arquivo dentro do banco de dados;	Total (R1)	JP09A_index9_GATCAG_L002_R1_005	JP09A_index9_GATCAG_L002_R1_004	JP09A_index9_GATCAG_L002_R1_003	JP09A_index9_GATCAG_L002_R1_002	JP09A_index9_GATCAG_L002_R1_001	Total (R2)	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R2_004	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R2_003	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R2_002	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R2_001	Total (R1)	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R1_004	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R1_003	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R1_002	JP08A_index8_ACTTGA_L002_R1_001	Total (R2)	JP07A_index7_CAGATC_L002_R2_004	JP07A_index7_CAGATC_L002_R2_003	Dataset	
<sup>2</sup> Predicted Protei		4581491.3	4581490.3	4581489.3	4581488.3	4581487.3		4581486.3	4581485.3	4581484.3	4581483.3		4581482.3	4581481.3	4581480.3	4581479.3		4581478.3	4581477.3	MG-RAST ID <sup>1</sup>	
in Features; <sup>3</sup> Predi	2353633656	117517948	560267381	561950759	552086193	561811375	11082699131	489562685	530415050	525061276	529483423	9008176697	521534059	561483442	549317858	559189030	6816652308	498276199	538128142	Bp count	
cted rRNA Feature	16276449	815014	3876756	3875953	3832325	3876401	77721855	3490059	3754163	3719966	3740140	63017527	3615684	3876808	3821819	3867210	47836006	3527613	3784939	Sequences count	
>s; <sup>4</sup> Identified	15103069	760298	3587716	3594016	3571947	3589092	72105982	3201333	3452800	3719966	3433608	58298275	3361587	3612153	3567009	3597475	44160051	3244964	3487413	PPF <sup>2*</sup>	
Protein F	149204	7573	35195	34653	36532	35251	744570	36966	39441	39171	39185	589807	35661	37691	39083	38569	438803	34752	36883	PrRF <sup>3*</sup>	
eatures; <sup>5</sup> lden	5168032	264318	1230946	1240404	1188221	1244143	25111088	1101600	1203039	1193634	1207017	20405798	1189272	1290769	1223310	1284441	15418006	1105671	1200878	IPF <sup>4*</sup>	
tified rRN/	2896	159	672	671	730	664	15443	678	716	746	733	12570	703	760	818	810	9479	674	719	IrRF <sup>5*</sup>	(Cor
V Features;	4053653	207801	965389	973146	931589	975728	19598844	854901	933066	926562	936864	15947451	923607	1001604	947771	997821	12076648	863046	938864	IFC <sup>6*</sup>	ıtinuação)

<sup>o</sup>Identified Functional Categories Dataset = nome do arquivo no MG-RAST; Bp count = valores de pares de base; Sequences count = valores de sequências \*Pós controle de qualidade

da	An
sop	exc
SE	Ē
Θ	ı Z
Sub	úme
Sys	ero
sten	de
٦S	pare
	b S
	e b
	ase
	e s
	equ
	lênc
	ias
	(re
	ads
	<u>);</u> ag
	se
	qüê
	inci
	as f
	orar
	n a
	nota
	idas
	pe
	0 1
	Ģ-
	RAS
	Ť
	afi
	liad
	as a
	às c
	ate
	goria
	as s
	iegu
	Indc
	0
	ban
	8
	de

Dataset

MG-RAST ID<sup>1</sup>

Bp count

Sequences count

PrRF<sup>3\*</sup>

IPF<sup>4\*</sup>

IrRF5\*

IFC<sup>6\*</sup>

(Conclusão)

					Área J3	
	Total (R2)	JP09A_index9_GATCAG_L002_R2_005	JP09A_index9_GATCAG_L002_R2_004	JP09A_index9_GATCAG_L002_R2_003	JP09A_index9_GATCAG_L002_R2_002	JP09A_index9_GATCAG_L002_R2_001
		4581496.3	4581495.3	4581494.3	4581493.3	4581492.3
	2229269634	110782185	526717613	531949838	527529062	532290936
	15763603	785561	3745095	3756159	3728073	3748715
4	13752720	72314	3418898	3436558	3399187	3425763
	153471	7849	36582	36425	36601	36014
5	4870199	246469	1141176	1160532	1154960	1167062
	2714	143	635	662	631	643
	3822123	194169	895039	910502	906571	915842

<sup>1</sup>*Número identificador do arquivo dentro do banco de dados; <sup>2</sup>Predicted Protein Features;* <sup>3</sup>*Predicted rRNA Features;* <sup>4</sup>*Identified Protein Features;* <sup>5</sup>*Identified rRNA Features;* <sup>6</sup>*Identified Functional Categories Dataset* = nome do arquivo no MG-RAST; *Bp count* = valores de pares de base; *Sequences count* = valores de sequências \*Pós controle de qualidade

Anexo F – Abundância taxonômica dos *reads* metagenômicos (classes) do filo bacteriano mais numeroso Proteobacteria (A), *Box plot* mostrando a distribuição das proporções de sequências de cada área dentro deste filo (IQR; 75 – 25% dos dados), a mediana e os valores extremos (barras) em relação a mediana (1,5\*IQR); o asterisco identifica a média dos dados (B) (*software* STAMP)







Anexo H – Tabela indicando os fatores ambientais significativos (λA) submetidos à Análise de Redundância (RDA) com as porcentagens que explicam a variação dos dados de forma independente quando correlacionados com valores de abundância de sequências de cada etapa do ciclo do N

Etapa do ciclo	Fator	Explicação total (%)
Assimilação de	Nitrato	43
amonia	Р	22
	H+AI	13
Desnitrificação	Queima	41
	V	23
	Torta de filtro	8
Redução	V	36
dissimilatoria do — nitrito	Carvão ativado	34
Amonificação	Mg	33
do nitrato e — nitrito (DNRA)	CTC	1
Óxido nítrico sintase	Produtividade	16
Fixação de	Produtividade	19
nitrogênio	МО	3

H+AI – acidez potencial; P – fósforo; V – saturação por bases; Mg – magnésio; CTC – capacidade de troca catiônica; MO – matéria orgânica

Anexo I – Dados utilizados para a construção do core microbiano. Análise dos perfis taxônomicos relacionados ao ciclo do N (Assimilação de amônia e fixação de nitrogênio) a nível de ordem (SEED database) dos solos das três áreas de cana-de-açúcar. Valores expressos em proporção média (%) apenas das ordens que apresentaram significância; PCAs dos perfis funcionais a nível de ordem (A a D) (Teste de ANOVA e post-hoc Tukey-Kramer a 0,95 corrigido por Benjamin-Hochberg FDR; p<0,05)</p>

#### Assimilação de amônia



Anexo J – Dados utilizados para a construção do core microbiano. Análise dos perfis taxônomicos relacionados ao ciclo do N (Redução dissimilatória do nitrito e óxido nítrico sintase) a nível de ordem (SEED database) dos solos das três áreas de cana-de-açúcar. Valores expressos em proporção média (%) apenas das ordens que apresentaram significância; PCAs dos perfis funcionais a nível de ordem (A a D) (Teste de ANOVA e post-hoc Tukey-Kramer a 0,95 corrigido por Benjamin-Hochberg FDR; p<0,05)</p>

#### в Desulfuromonadales Α 95% confidence interval | <0.02 g filo 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 Area A : Area I 0.04 2.0 -0.2 0.0 Mean proportion (%) Diffe rence in mean prop 0.02 Sphingomonadales PC2 (11.2%) 95% confidence intervals Area F : Area A 1.3 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 1.8 <0.05 P 0.00 0.0 Mean proportion (%) Difference in mean propo ns (%) ο Δ 0 Δ Bacteria -0.02 unclassified (derived from Gammaproteobacteria 95% confidence intervals -0.04 Δ - <0.05 P -0.05 0.00 PC1 (84.1%) 0.00 0.0 0.1 Mean proportion (%) -0.15 -0.10 0.05 0.10 Xanthomonadales 95% confidence intervals Area F : Area J 0.5 0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 Proteobacteria 0.0 Mean proportion (%) Differ ence in mean proportions (%) Óxido nítrico sintase С D Nostocales 95% confidence intervals filc 0.03 Area J : Area F 📕 Area A : Area F ------Cyanobacteria 0.02 0.8 0.00 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35 00 Mean proportion (%) Difference in mean proportions (%) 0.01 PC2 (8.7%) Methylacidiphilales 95% confidence intervals 0.1 0.00 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 0.14 0.16 0.18 Area J : Area F 0.00 Verrucomicrobia 0.0 **△** Mean proportion (%) Difference in mean proportions (%) -0.01 Δ 0 unclassified (derived from Actinobacteria (class)) -0.07 Δ 95% confidence intervals Area F : Area A 0.05 < 0.02 Racteria -0.10 0.00 Actinobacteria PC1 (84.2%) 0.0 0.2 Mean proportion (%) Difference in mean proportions (%) Sphingomonadales 95% confidence intervals 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 Area F : Area J 2.3 -0.5 0.0 Moon properties (%) Vibrionales 95% confidence intervals \_\_\_\_\_ <0.01 Area F : Area J 0.0 0.0-0.005 0.000 0.005 0.010 0.015 0.020 0.025 0.030 0.035 Mean proportion (%) Difference in mean proportions (%) Proteobacteria 🔲 Área A 🔜 Área F 🔜 Área J

### Redução dissimilatória do nitrito

Anexo L – Dados utilizados para a construção do core microbiano. Análise dos perfis taxônomicos relacionados ao ciclo do N (Aonificação do nitrato e nitrito e desnitrificação) a nível de ordem (SEED database) dos solos das três áreas de cana-de-açúcar. Valores expressos em proporção média (%) apenas das ordens que apresentaram significância; PCAs dos perfis funcionais a nível de ordem (A a D) (Teste de ANOVA e post-hoc Tukey-Kramer a 0,95 corrigido por Benjamin-Hochberg FDR; p<0,05)</p>

#### Amonificação do nitrato e nitrito







Desintrincação	Despitritiona	Fixação do nitrogênio		Redução do nitrito – parte II			Neudçao do minato – parte r	Dedicão do pitrato - parte l		Redução da hidroxilamina	Nitritação		Etapa		
1b	1a		2c	2b	2a	1d	1c	1b	1a						
1.7.99.7	1.7.2.1	1.18.6.1	1.7.1.4	1.7.7.1	1.7.2.2	1.7.99.4	1.7.1.3	1.7.1.1	1.7.7.2	1.7.99.1	1.7.3.4		E.C.	1	
2,3E-05	4,9E-05	7,5E-06	1,2E-04	7,0E-05	1,8E-05	2,6E-04	4,7E-07	4,2E-05	2,3E-06	1,3E-06	1,8E-06	Área A1			
1,7E-05	2,9E-05	5,8E-06	8,7E-05	6,0E-05	1,3E-05	1,8E-04	4,1E-07	2,8E-05	2,0E-06	5,4E-07	2,5E-06	Área A2	Área A		
2,0E-05	3,7E-05	3,3E-06	9,7E-05	8,7E-05	1,2E-05	2,4E-04	1,3E-07	4,5E-05	2,4E-06	8,7E-07	2,1E-06	Área A3			
2,5E-05	3,0E-05	2,5E-06	1,3E-04	8,1E-05	1,1E-05	1,7E-04	6,0E-07	4,2E-05	3,6E-06	5,3E-07	1,6E-06	Área F1		Me	
2,4E-05	3,6E-05	7,7E-06	1,2E-04	7,4E-05	1,2E-05	2,3E-04	3,3E-07	3,2E-05	2,2E-06	1,9E-06	2,2E-06	Área F2	Área F	etagenoma	
2,6E-05	2,5E-05	3,8E-06	1,2E-04	9,1E-05	1,2E-05	1,9E-04	2,0E-07	4,2E-05	3,5E-06	1,0E-06	3,3E-06	Área F3			
1,7E-05	2,9E-05	2,2E-06	8,7E-05	7,1E-05	1,3E-05	2,0E-04	2,7E-07	3,4E-05	2,2E-06	1,2E-06	1,4E-06	Área J1			
1,9E-05	1,7E-05	2,8E-06	9,4E-05	8,4E-05	8,2E-06	1,8E-04	6,8E-08	3,4E-05	2,8E-06	5,4E-07	1,1E-06	Área J2	Área J		
1,6E-05	1,7E-05	2,0E-06	8,6E-05	8,1E-05	5,6E-06	1,3E-04	2,0E-07	3,4E-05	1,5E-06	6,7E-08	1,9E-06	Área J3			

	nexo N –
do ciclo do nitrogênio.	Abundância de hits relacionados à classificação enzimática (E.C.) baseada no banco de dados KEGG. As enzimas correspondem às etapas

122 An





ue ca	ina-ue-a	çucai no estau	de sau nadio poi drich e inter a patti da atti	pillicação da legião dos gelles <i>anio</i> A e <i>nin</i> n
Técnica Gene a	Ilvo	Primers	Sequências (5' <del>&gt;</del> 3')	Referência
		amo196F	GGW GTK CCR GGR ACW GCM AC	TREUSCH et al., 2005
	ACA	amo277R	CRA TGA AGT CRT AHG GRT ADC C	TREUSCH et al., 2005
aPCR	>	amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	ROTTHAUWE et al., 1997
4		amoA-2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	ROTTHAUWE et al., 1997
Hia		FGPH19	TAC GGC AAR GGT GGN ATH	SIMONET et al., 1991
		PoIR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG	POLY et al., 2001
			1	Enzima
		Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	FRANCIS et al., 2005
		Arch-amoAR	*FAM- GCGGCCATCCATCTGTATGT	FRANCIS et al., 2005
		amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	ROTTHAUWE et al., 1997
		amoA-2R	*FAM-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	ROTTHAUWE et al., 1997
*Indica a marcação	do prim	<i>er</i> com o fluoró	foro a ser detectado na leitura a laser dos TRFs	

Anexo P – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos alvo a partir do DNA das amostras de solo coletadas em três áreas de cultivo de cana-de-acúcar no estado de São Paulo por oPCR e T-RFLP a partir da amplificação da região dos genes *amo*A e *nit*H

Anexo Q – Análises de redundância (RDA) resultantes da correlação dos fatores ambientais químicos (gráfico à direita) e físicos (gráfico à esquerda) com os perfis da estrutura microbiana de bactérias (AOB) e arquéias (AOA) amônioxidantes baseados em T-RFLP dos solos das três áreas

