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

A interface entre a física e os aspectos microbiológicos do solo

Alessandra Rigotto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2017**

Alessandra Rigotto
Engenheira Agrônoma

A interface entre a física e os aspectos microbiológicos do solo
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2017

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

Rigotto, Alessandra

A interface entre a física e os aspectos microbiológicos do solo /
Alessandra Rigotto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr
6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

85 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz".

1. Cana-de-açúcar 2. Microbiologia do solo 3. Ciclo do nitrogênio 4.
Diversidade I. Título

*Dedico este trabalho
aos meus pais Edson e Eliana,
ao meu irmão Lucas
e ao meu namorado Pedro,*

*Vocês são minhas maiores motivações
no caminho para minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edson e Eliana por toda educação, incentivo e principalmente valores que permitiram eu alcançar meus objetivos;

Ao meu irmão Lucas por sempre me ensinar a ver outros pontos de vista;

Ao meu namorado Pedro pela companhia, carinho, conselhos, risadas e pelos abraços apertados que melhoram meus dias;

Ao professor Fernando Dini Andreote pela oportunidade, apoio e orientação para a realização deste trabalho;

A Simone e ao Armando por estarem comigo em todas as etapas da realização desse projeto, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, conselhos e principalmente pela amizade (Valeu Pissual);

Ao professor Álvaro (*in memoriam*) que apoiou iniciarmos este estudo;

Ao pesquisador João Luis Nunes Carvalo do CTBE pelo convite de participar de seu projeto de pesquisa e ao Leandro e Lauren (Chaves) pelas facilidades de informações;

Aos amigos do laboratório: Kelly, Yasmin, Bruninha, Dani, Michele, Myllene, Lucas, Polé, Juliana, Júlia, Diogo, Dorotéia, Cátia, Maiele, Carol e em especial ao Pedro e Arthur pelas risadas e por saber que sempre posso contar com vocês;

Ao Thiago Gumiere pelos ensinamentos de estatística para a jovem Padawan;

Ao Victor Pylro pela ajuda com sequenciamento e pelos bolos de chocolate;

Aos técnicos do laboratório: Denise, Fernandinho e principalmente a Sônia que tornaram a rotina de laboratório mais leve e descontraída, e pelos cafézinhos;

A Sâmala e ao Gabriel Nuto Nóbrega pela ajuda nas análises físicas deste projeto;

Ao Rafael V. Popin (Minisérie) pelo auxílio nas clonagens;

A Márcia Leite pela ajuda em diversas partes deste trabalho e também pelas risadas;

Ao Saulo (Potão) por sempre estar disposto a me ajudar e tirar dúvidas ao longo dos experimentos e durante a coleta;

Tatiane Loureiro por ter sido a primeira pessoa a me ensinar os processos básicos de um laboratório, pela paciência, dedicação e por abrir oportunidades durante a minha graduação;

A República Saia-Justa, especialmente para Coqs, NPK, 14, Balus e Gugs;

A Coordenação do PPG - Solos e Nutrição de plantas e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR	11
2.2. COMPACTAÇÃO DO SOLO.....	13
2.3. MICRORGANISMOS DO SOLO	14
2.4. ETAPAS DO CICLO DO NITROGÊNIO E A INFLUÊNCIA DA COMPACTAÇÃO DO SOLO..	17
2.4.1. Fixação Biológica do Nitrogênio	19
2.4.2. Nitrificação.....	21
2.4.3. Desnitrificação	22
3. HIPÓTESE	25
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS.....	29
5.2. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS	30
5.3. COLETAS DE SOLO	31
5.4. ATRIBUTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DOS SOLOS COLETADOS.....	31
5.5. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DO SOLO	32
5.6. ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS E FUNGOS TOTAIS POR T-RFLP	32
5.7. ANÁLISE DO T-RFLP	33
5.8. ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE ARQUÉIAS E DOS GRUPOS AOA, AOB E NIFH POR PCR-DGGE	34
5.8.1. Reação de amplificação do gene 16S DNAr de arqueias presentes no solo.....	34
5.8.2. Reação de amplificação do gene amoA de AOA presentes no solo	34
5.8.3. Reação de amplificação da região do gene 16S DNAr de AOB presentes no solo.....	35
5.8.4. Reação de amplificação do gene nifH para diazotróficos presentes no solo.....	36

5.9.	ANÁLISE DO DGGE.....	36
5.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE T-RFLP E DO DGGE	37
5.11.	QUANTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES ALVO POR PCR EM TEMPO REAL	38
5.11.1.	Reações de quantificação da comunidade microbiana do solo.....	38
5.11.2.	Reações de quantificação de organismos nitrificantes.....	39
5.11.3.	Reação de quantificação de organismos fixadores de N	40
5.11.4.	Reações de quantificação de organismos desnitrificantes.....	40
5.12.	ANÁLISE DOS DADOS DE QPCR.....	41
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DOS SOLOS.....	43
6.2.	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA	49
6.2.1.	Análise da estrutura da comunidade microbiana.....	50
6.2.2.	Análise da abundância das comunidades microbianas	52
6.3.	COMUNIDADES ASSOCIADAS AO CICLO DO NITROGÊNIO	54
6.3.1.	Análise da composição de microrganismos nitrificantes.....	54
6.3.2.	Análise da composição de microrganismos fixadores de N.....	58
6.3.3.	Análise de abundância dos microrganismos desnitrificantes.....	61
7.	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS.....	79

RESUMO

A interface entre a física e os aspectos microbiológicos do solo

A cultura da cana-de-açúcar é a segunda maior cultura em valor de produção agrícola do país. Nos últimos anos ocorreu uma alteração no cenário canavieiro passando de colheita manual de cana queimada para mecanizada de cana crua. A colheita mecanizada da cana-de-açúcar acarreta muitos benefícios ambientais, porém o tráfego intenso de maquinários resulta na compactação do solo. Desse modo, buscamos avaliar como o efeito das alteração física do solo causado pelo tráfego de máquinas durante a colheita da cana interfere na composição das comunidades microbianas, especialmente as que participam das transformações do nitrogênio. As parcelas experimentais foram divididas em colheita manual (PDTR) e colheita mecanizada (PD). Todos os demais manejos e tratos culturais foram iguais, isolando a influência do impacto do maquinário durante a colheita. Para a avaliação da microbiota realizamos análise da estrutura da comunidade (DGGE ou T-RFLP) e análise de abundância (qPCR) de bactérias, fungos, arqueias, e do ciclo do nitrogênio envolvendo os genes marcadores para a nitrificação (*amoA* - AOA e AOB), fixação de nitrogênio (*nifH*) e desnitrificação (*nirK*, *nirS*, *nosZ* clado I e II). Observamos apenas a diferença dos parâmetros físicos na camada superficial por meio da resistência a penetração. A alteração no perfil da comunidade de bactérias e arqueias mostra que ambas são responsivas ao tratamento com tráfego do maquinário. Em relação aos microrganismos envolvidos nas transformações de nitrogênio, AOA foi altamente responsiva ao impacto do tráfego agrícola em ambos os tipos de textura, mas teve diferença na abundância apenas no solo arenoso. O gene *nifH* apresentou diferença na diversidade em solo argiloso e diferença de abundância em solo arenoso. E por fim, sugerimos que o gene *nosZ* em subsuperfície pode indicar uma possível compactação antes dos parâmetros físicos do solo.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Microbiologia do solo; Ciclo do nitrogênio; DGGE; qPCR

ABSTRACT

The interface between soil physical and microbiological aspects

In Brazil, sugarcane is the second most value of agricultural production. Lately, the harvest management in sugarcane fields has changed from manual harvesting methods with pre-harvest burns to mechanical harvests with green cane (unburnt harvest). The mechanized harvest brings many ambiental benefits. However, the intense traffic due to agricultural machines over the years is resulting in soil compaction. The purpose of this work was to evaluate how the physical effect of mechanized harvesting can interfere with the composition of soil microbial community, specially the microbial involved in the nitrogen cycle. Experimental plots were divided into manual harvest (PDTR) and mechanized harvest (PD). All aspects of crop management are the same, so we were able to study the impact of mechanical harvester traffic during the harvest in isolation. To evaluation of the microbiome we analyzed community structure (DGGE ou T-RFLP) along with their abundance (qPCR) for soil bacterial, fungal and archaeal, and microorganisms involved in the transformation of nitrogen that we used gene markers for nitrification (*amoA* – AOA and AOB), nitrogen fixation (*nifH*) and denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZ* clade I and II). We observed the difference between physical parameters only in topsoil by soil penetration resistance. Our results indicated structured community changes of bacterial and archaeal showed us that both are responsive to treatment of machinery traffic. Microorganisms involved in the nitrogen cycle, our results presented that AOA is highly responsive to the impact of agricultural traffic on both soil texture, but we observed the difference in abundance only in sandy soil. The *nifH* gene was different on community structure in clay soil and on abundance in sandy soil. Moreover, we suggest that *nosZ* gene could indicate a possible soil compaction before the physical parameters in a layer between 20 and 40 cm.

Keywords: Sugarcane; Soil microbiology; Nitrogen Cycle; DGGE; qPCR

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar foi introduzida no Nordeste brasileiro durante período colonial, no início do século XVI, adaptando-se rapidamente ao clima tropical favorável. Durante esse período, gerou grandes recursos financeiros devido ao alto valor agregado de seu principal produto na época, o açúcar. Atualmente, o Estado de São Paulo possui a maior parte das áreas cultivadas e da produção nacional, sendo os principais produtos derivados desta cultura o açúcar e o etanol.

Nos últimos anos, nota-se a crescente preocupação e a discussão sobre os problemas ambientais gerados pelo homem, sendo um dos principais temas o aquecimento global causado pelo aumento das emissões dos gases do efeito estufa. Apesar de ser considerada uma alternativa na produção de biocombustível renovável, o fato que o processo de colheita de cana-de-açúcar era antecedido pela queima do canavial, não era possível afirmar que se tratava de uma produção sustentável do etanol. Com isto, em 2002 foi implementada uma lei que prevê a redução gradual da queima até a sua proibição total. Esse novo panorama acarretou em um maior grau de mecanização dos canaviais, alterando desde o sistema de plantio até o sistema de colheita, influenciando positivamente a conservação do solo, redução nas emissões de CH_4 e N_2O , além dos diversos benefícios adquiridos pela deposição da palhada sobre a superfície do solo. Entretanto, o tráfego intenso de maquinarias agrícolas pesadas em um curto período de tempo, realizado em uma mesma área, vem acarretando numa maior compactação dos solos cultivados com cana-de-açúcar.

A compactação do solo altera sua estrutura física, reduzindo a porosidade total e aumentando a densidade do solo, conseqüentemente interferindo na infiltração de água no solo, na circulação de gases e na disponibilidade de nutrientes, além de afetar a penetração do sistema radicular no solo causando perdas de produtividade na cultura. Além destes conhecidos efeitos da compactação, é também observado que este processo leva a modificações nas condições dos micro-habitats para os microrganismos do solo, os quais são responsáveis por etapas fundamentais para os ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, como do carbono, nitrogênio e enxofre.

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da colheita mecanizada no solo sobre a fração microbiológica do solo, envolvendo a diversidade

e abundância dos grupos taxonômicos (bactérias, fungos e arqueias) e dos grupos funcionais que participam do ciclo do nitrogênio (marcadores moleculares gene *nifH*, *amoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* e *nosZII*). Estas comunidades microbianas foram analisadas qualitativa e quantitativamente em dois sistemas de cultivo, sendo um deles o sistema comumente adotado e o outro uma possibilidade de manejo com o tráfego agrícola reduzido. Os resultados deste trabalho constituem a primeira evidência da conexão entre as características físicas e biológicas dos solos cultivados com cana-de-açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, originária do sudeste asiático, pertencente ao gênero *Sccharum* e a família *Poaceae*. A cultura foi introduzida no Brasil nas primeiras décadas do século XVI por apresentar um clima tropical favorável ao seu desenvolvimento. Desse modo, a cultura mostrou ótima adaptação e tornou o país um destaque mundial na produção de açúcar (BALASTREIRE, 1998). Outro produto dessa cultura, o etanol, só se tornou uma fonte de riqueza nos últimos 40 anos com a criação do programa Proálcool em 1975, possibilitando o crescimento da produção do biocombustível (BELARDO et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FAO, 2013), com a produção de 666,8 milhões de toneladas na safra 2015/2016. Ocupa o primeiro lugar como produtor mundial de açúcar, responsável por 25% da produção e 50% das exportações mundiais. Além disso é o 2º produtor mundial de etanol, sendo responsável por 20% da produção e 20% das exportações mundiais (UNICA, 2017). Nesse cenário, o país é reconhecido mundialmente pela utilização de uma matriz energética renovável que envolve a cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol e bioeletricidade (UNICA, 2017). Desse modo, essa diversificação de produtos fez com que a cana-de-açúcar se tornasse a segunda maior cultura em valor de produção agrícola do país (BELARDO et al., 2015).

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional desta cultura, onde se localiza 59% das áreas plantadas no país (Figura 1). Consequentemente, também o maior produtor potencial de açúcar e etanol, com a produção de 368 milhões de toneladas de cana na safra de 2015/2016, ou seja, 55% da produção brasileira (UNICA, 2017).

Figura 1: Mapeamento dos cultivos da cana-de-açúcar no Brasil. Fonte: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_17_10_07_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf

Na última década foi implementada a Lei 11.241/2002, que prevê a erradicação gradual da queima da cana-de-açúcar em áreas mecanizáveis (áreas superiores a 150 hectares e com declividade menor que 12%) até o ano de 2021 e em regiões não mecanizáveis até o ano de 2031 válido para todo o território nacional. Em 2007, o governo do estado de São Paulo assinou o Protocolo Agroambiental do Setor Sucroenergético, que determina a antecipação dos prazos legais para o fim da despalha da cana por meio do uso de fogo para 2014 para as áreas mecanizáveis e 2017 para as áreas não mecanizáveis.

A queima da cana-de-açúcar, prática realizada para facilitar as operações de colheita, acarreta danos ambientais devido a emissão de gases de efeito estufa, como metano e óxido nitroso, além de danos à saúde da população próxima as regiões canavieiras, além de prejudicar a flora e fauna local. Os benefícios da proibição da queima da palha vão além da redução de 20% de dióxido de carbono, pois ao não ser queimada e permanecendo na superfície do solo após a colheita mecanizada, a palhada resultante deste cultivo exerce a função de proteção contra a erosão do solo (LOBO, 2011).

O Protocolo Agroambiental do Setor Sucroenergético, publicado em dezembro de 2014, relata o avanço tecnológico nos canaviais que permitiu que a colheita da cana crua na safra de 2009/2010 superasse a colheita realizada com a queima. Na publicação de 2016, o relatório afirma que mais de 90% das áreas do estado de São Paulo apresentam colheita mecanizada. No entanto, com essa mudança do cenário da prática de colheita ocorreu uma intensificação da mecanização no campo, levando ao agravamento de um importante fator que causa impactos no solo, a compactação.

2.2. Compactação do solo

Na agricultura moderna, a grande revolução no campo foi dada pela mecanização, que permitiu o homem realizar o trabalho com maior facilidade e eficiência, levando a um aumento da produtividade e uma maior rentabilidade. Mas atualmente, o tráfego frequente com equipamentos pesados nas áreas de cultivo é um dos principais problemas que a agricultura está enfrentando, pois este processo intensificou a compactação dos solos (DE NEVE; HOFMAN, 2000).

A compactação é o adensamento do solo pela aplicação de uma energia mecânica (HOLTZ et al., 2010), a qual pode ocorrer naturalmente ou por atividades realizadas pelo homem. Os principais efeitos prejudiciais da compactação é a redução da infiltração de água no solo, que aumenta o risco de erosão, associado com uma redução da movimentação de gases, da água e da disponibilidade de nutrientes no solo. Além disso, a compactação leva a uma redução da penetração e da ramificação das raízes por excessiva resistência mecânica e aeração deficiente, podendo afetar o desenvolvimento vegetativo da parte aérea das plantas (HAKANSSON; VOORHEES, 1998).

Diversos fatores influenciam a compactação do solo, tornando-a de difícil mensuração, pois as propriedades físicas do solo variam em função do tempo, sob a influência do clima (diretamente relacionado com o teor de água no solo), manejo do solo e desenvolvimento da planta. Os principais métodos de avaliação da compactação são baseados na densidade do solo, na porcentagem de macroporos e na resistência do solo à penetração (BELARDO et al., 2015).

Em culturas semi-perenes, como a cana-de-açúcar (em que o ciclo é de 4 a 5 anos), a compactação gera um impacto ainda maior que nas culturas anuais

(BELARDO et al., 2015). A colheita da cultura é realizada em linhas simples acompanhada do veículo de transbordo na linha adjacente, resultando em um tráfego intenso de maquinários na operação, provocando o aumento da densidade do solo até a profundidade de 0,40 m (VASCONCELOS et al., 2002).

Um exemplo dessa problemática é demonstrado no estudo realizado durante os primeiros anos da implantação da cultura da cana-de-açúcar, quando ficou demonstrado que a pressão exercida pelos diferentes tipos de máquinas agrícolas (variação nos tipos de pneus e eixos) na camada superficial do solo (0-10 cm) pode variar de 150 a 750 kPa (LOZANO et al., 2013). Outro trabalho mostrou imagens contrastantes formadas por microtomografia de raio-X no solo após a compactação, resultando em uma redução do volume dos poros entre os agregados e aumento na proporção de volume dos poros de intra-agregados, o que diminui o potencial de penetração de água no solo (MENON et al., 2015).

Diversos trabalhos sobre a compactação estudam a alteração das características físicas do solo que comprometem a qualidade do solo e as consequências para a cultura. Mas recentemente, modelos matemáticos incluem aspectos microbiológicos correlacionado com a física do solo (tamanhos dos agregados) para estimar taxas de produção de gases do efeito estufa N_2O e CO_2 (HEBRAHIMI; OR, 2016).

A influência de vários fatores resultantes da compactação do solo, como a disponibilidade de O_2 , o teor de água, porosidade total e a penetração das raízes no solo, podem promover alterações da estrutura da comunidade microbiana, interferindo significativamente em suas capacidades de transformações e ciclagem de nutrientes (PUPIN, 2008).

2.3. Microrganismos do solo

O solo é o habitat que apresenta maior biodiversidade microbiana do planeta, onde estima-se que em um grama de solo está presente 10^9 células, divididas em milhares de espécies. Esses microrganismos apresentam uma grande plasticidade genética e metabólica, e estão presentes nos três domínios da classificação dos seres vivos (TORSVIK et al., 2002). Essa elevada abundância e diversidade estão diretamente relacionadas com a funcionalidade nesse ambiente, atuando na decomposição da matéria orgânica e na realização de ciclos biogeoquímicos, como do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, afetando a disponibilidade desses

nutrientes no solo (VAN ELSAS et al., 2006). Além disso, a microbiota do solo também é responsável pela promoção do crescimento vegetal, supressão de doenças em plantas, degradação dos contaminantes e estabilização da estrutura do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2010; MENDES et al., 2011). Entretanto, a comunidade microbiana no solo também pode influenciar negativamente na agricultura, como exemplo os fitopatógenos, interferindo diretamente na produtividade da cultura (HEIJDEN et al., 2008). Outro fator interessante da microbiota do solo é que algumas espécies de bactérias atuam em conjunto e competem com patógenos, assim podem evitar a ação negativa desses microrganismos (VAN ELSAS et al., 2012).

Na cultura da cana-de-açúcar, estudos estão sendo realizados sobre a diversidade microbiana e sua associação com esta cultura, buscando a melhor compreensão desse sistema. Como exemplos, podemos citar a identificação de enzimas glicosil-hidrolases nos microrganismos presentes em bagaço de cana-de-açúcar, enzimas estas que auxiliam na degradação da celulose (KANOKRATANA et al., 2015), isolados de bactérias rizosféricas e endofíticas com potencial de promoção de crescimento na cana (de SANTI FERRARA et al., 2012), alteração da estrutura da comunidade bacteriana e de sua função associada a biodegradação do herbicida atrazina (FANG et al., 2015), entre outros.

Estudos diretamente correlacionados com a microbiota do solo utilizado para o cultivo da cana-de-açúcar descrevem a existência de uma ampla diversidade bacteriana nos solos cultivados com essa cultura, composta principalmente por organismos dos filos *Proteobacteria* (34,7%), *Actinobacteria* (28,1%), *Firmicutes* (16,2%) e *Acidobacteria* (9,7%) (DINI-ANDREOTE et al., 2010). E recentemente, um estudo comparou as diferenças na estrutura e na abundância da comunidade bacteriana e fúngica em diferentes partes da cana-de-açúcar e analisou a microbiota do solo, concluindo que o solo serve como um reservatório de organismos que colonizam a planta (SOUZA et al., 2016). Outros estudos mostram a visão da distribuição biogeográfica de bactérias (DURRER et al., 2017) e de fungos (GUMIERE et al., 2016) de solos cultivados com cana-de-açúcar, afirmando que existe uma variação no perfil de sua comunidade ao longo de uma distribuição espacial, sendo um dos fatores de influencia a classe textural do solo.

Outro aspecto a ser considerado é referente as práticas de manejo adotadas que podem influenciar a comunidade microbiana do solo. Trabalhos demonstram como

os diferentes tratamentos culturais realizados com a cultura da cana-de-açúcar podem interferir diretamente na comunidade microbiana, como por exemplo a adubação nitrogenada, que levou a uma alteração na estrutura da comunidade bacteriana rizosférica, com destaque para a supressão das bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio (YEOH et al., 2015). Além disso, observou-se que os sucessivos anos de cultura canavieira na mesma área levaram a uma seleção de um aumento na quantidade de bactérias na região rizosférica das plantas (SAVARIO et al., 2010).

Recentemente, estudos realizados compararam os sistemas de colheita mecanizada e de colheita com queima, mostrando que a utilização de substratos com carbono e a diversidade metabólica tiveram valores mais baixos em cana crua (AZEVEDO et al., 2015). Além disso, apesar de se manterem inalteradas as taxas de produção de gases do efeito estufa, microrganismos associados ao ciclo do nitrogênio (desnitrificantes – *nirK* e nitrificantes – *amoA*) foram responsivos, mostrando alteração na estrutura dessas comunidades (RACHID et al., 2012). Outro trabalho realizou o sequenciamento de bactérias totais do solo e obtiveram que os filos mais abundantes foram *Acidobacteria* (<35%), *Proteobacteria* (<24%) e *Actinobacteria* (<21%), sendo que o único filo que apresentou diferença entre os tratamentos foi o *Firmicutes*, encontrado com maior frequência no tratamento de cana crua (RACHID et al., 2013).

Tem sido descrito na literatura diferentes trabalhos que demonstram a diferença na resposta microbiológica entre o manejo de colheita da cana crua e da cana queimada. Esses diferentes manejos envolvem várias alterações de fatores que influenciam o microbioma, como por exemplo, o resíduo de palha da cana-de-açúcar na superfície do solo, seu efeito sobre a temperatura e a umidade do solo, além de alterar a fonte e o estoque de carbono, e por conseguinte modificar a ciclagem dos nutrientes (ROSSETTO et al., 2008).

Considerando a relação entre a física e a biologia do solo, foram realizadas avaliações referentes ao efeito dos micro-habitats provenientes da agregação do solo submetida a uma destruição física seguida de análise da estrutura da comunidade bacteriana. Notou-se que a diversidade bacteriana aumentou após a destruição física dos agregados do solo (ZHANG et al., 2010). Essa resposta a compactação é diferenciada quando avaliamos solos com diferentes teores de argila. A compactação causada pela colheita de madeira mostrou que em dois solos de textura média apresentou uma redução na abundância, um aumento da

diversidade e alteração na estrutura da comunidade microbiana, sendo que o solo com maior teor de argila (50% mais argila em comparação com o outro solo em estudo) foi menos resistente e resiliente a alteração (HARTMANN et al., 2014).

Considerando outros sistemas biológicos, como por exemplo, o que ocorre na mudança do uso do solo da Floresta Amazônica para pastagem, também notou-se uma maior abundância de microrganismos metanogênicos e metanotróficos, sendo estas alterações relacionadas com a compactação do solo (LAMMEL et al., 2015). Sendo assim, a mudança da estrutura da comunidade microbiana devido à alteração física do solo pode resultar na modificação da atividade microbiana nas transformações dos nutrientes do solo, comprometendo entre outros, o ciclo do nitrogênio.

2.4. Etapas do ciclo do nitrogênio e a influência da compactação do solo

O nitrogênio (N) é um elemento que compõe as proteínas e os ácidos nucleicos, o que faz deste essencial para a vida de todos os organismos (BRADY; WEIL, 2013). O N é encontrado na natureza em vários estágios de oxidação, desde a sua forma mais oxidada (nitrato) até o sua forma mais reduzida (amônio), sendo os microrganismos presentes no solo responsáveis por essas transformações (HAYATSU et al., 2008). Na Figura 2, podemos observar as principais vias biológicas de transformações do nitrogênio. O nitrogênio atmosférico é incorporado ao sistema solo através da Fixação Biológica de N (FBN) realizada por bactérias, as quais reduzem o N_2 para NH_3 (ZEHR et al., 2003). Uma outra via importante para a entrada de NH_4^+ no solo é a via assimilatória de redução do nitrato, que ocorre a conversão de NO_3^- para NH_4^+ (SILVER et al., 2001). O NH_4^+ é utilizado por muitos organismos em seus metabolismos como fonte de N. Quando os organismos morrem, o amônio retorna ao ambiente tornando novamente disponível (CANFIELD et al., 2010).

Em presença do oxigênio, o amônio é oxidado à nitrato por grupos específicos de bactérias e arqueias. Essa via é conhecida por nitrificação, e é realizada em duas etapas sendo cada etapa realizada por grupos distintos de microrganismos (PAJARES e BOHANNAN, 2016). Primeiramente o amônio é oxidado a hidroxilamina, o qual é logo em seguida oxidado para nitrito, e finalmente o nitrito

oxidado em nitrato. Recentemente foi descrito uma bactéria do gênero *Nitrospira* capaz de realizar as duas etapas (DAIMS et al., 2015).

Na ausência de oxigênio, o nitrato pode ser utilizado como receptor de elétrons em cadeias respiratórias por muitos microrganismos. A via dissimilatória de redução de nitrato para amônio (DRNA) ocorre em condições anaeróbicas de oxidação do carbono orgânico (SILVER et al., 2001). Entretanto, a via mais comum é a de desnitrificação com a produção de gás N_2 . Os organismos desnitrificantes são diversos, pertencentes a mais de 60 gêneros de bactérias e arqueias, e também é realizada por alguns eucariotos (DEMANÈCHE et al., 2009; PIÑA-OCHOA et al., 2010). O processo envolve 4 enzimas: nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase, e óxido nitroso redutase (ZUMFT, 1997). Um fato importante é que o N_2O é um intermediário obrigatório dessa etapa, tornando esse processo essencial para os estudos de emissão de gases do efeito estufa (CANFIELD et al., 2010).

E por fim, a etapa conhecida por *anammox* (oxidação anaeróbica de amônio) é uma via alternativa da rota para a liberação do nitrogênio na atmosfera. Os microrganismos responsáveis por esse processo acoplam a oxidação do amônio com a redução de nitrito, resultando na produção do gás nitrogênio (STROUS et al., 2006). Com isso, os processos de desnitrificação e *anammox* fecham o ciclo retornando o N_2 à atmosfera.

biológica de N na cana-de-açúcar no Brasil é de 40 kg de N.ha⁻¹ por ano, ou seja, em torno de 20% do N assimilado pela planta (HERRIDGE et al., 2008). Outros estudos estimam que esse valor possa atingir 100 kg de N.ha⁻¹ por ano alcançando 60% da exigência da planta (URQUIAGA et al., 2012). A elevada aplicação de fertilizantes nitrogenados é um dos motivos da supressão das bactérias diazotróficas fixadora de N na cana-de-açúcar (YEOH et al., 2015). As classes dominantes dos microrganismos que carregam o gene *nifH* são *Alphaproteobacteria*, seguido de *Beta*- e *Gammaproteobacteria* (PEREIRA E SILVA et al., 2013).

O processo de fixação de N ocorre em condições baixa disponibilidade de oxigênio no solo, o que portanto poderia aumentar significativamente a taxa de fixação biológica de N em solos compactados, pois a presença de O₂ inibe a atividade da enzima nitrogenase. Entretanto, estudos realizados com isótopo de ¹⁵N mostraram que monocultura e elevada taxa de compactação do solo contribuiu para a redução de 30% da fixação biológica do N (ST-MARTIN; BOMMARCO, 2016). Da mesma forma, altos níveis de compactação em trevo-branco também apresentaram redução nas taxas de fixação biológica de N (STURITE; DALMANNSDOTTIR; MURRAY, 2012).

Atualmente já conhecemos que os microrganismos fixadores de N são influenciados por muitos parâmetros químicos do solo, como disponibilidade de oxigênio, pH, quantidade de carbono e disponibilidade de N (HSU e BUCKLEY, 2009). Além destes, alguns fatores físicos podem afetar a atividade destes organismos, como a textura do solo (POLY et al., 2001; PEREIRA E SILVA et al., 2011) ou teor de argila no solo (ROPER e SMITH et al., 1991).

Os grupos de organismos fixadores de nitrogênio e os oxidadores de amônia apresentam baixa redundância funcional (KOWALCHUK e STEPHEN, 2001; PANKHURST et al., 1995), ou seja, as funções realizadas por esses microrganismos apresentam baixa diversidade metabólica, tornando-as limitadas a determinadas condições ambientais. Por serem altamente responsivos a alterações ambientais, esses dois processos foram estabelecidos como indicadores da qualidade do solo para determinar a variação da flutuação natural dessas funções, conhecido como NOR (*Normal Operating Range*) (PEREIRA e SILVA et al., 2013).

2.4.2. Nitrificação

O processo de nitrificação é a oxidação aeróbia do íon amônio a nitrato. É dividido em duas etapas: primeiro da amônia em nitrito (nitritação) e depois em nitrato (nitratação). A importância dessa etapa é sobre a disponibilidade do N no solo (BRADY; WEIL, 2013).

Os microrganismos oxidadores de amônia são responsáveis por oxidar NH_3 em nitrito utilizando a enzima amônia monooxigenase. Um marcador molecular muito utilizado para estudar esse processo é o gene *amoA*, o qual codifica a subunidade alfa dessa enzima (ROTTHAUWE et al., 1997). Os microrganismos capazes de realizar esta etapa da ciclagem do nitrogênio são denominadas: Bactérias Oxidadoras de Amônia (AOB – *ammonia oxidizing bacteria*) representadas pelas espécies *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrosococcus*; e Arquéias Oxidadoras de Amônia (AOA – *ammonia oxidizing archaea*), representadas por *Nitrososphaera* e *Nitrosotalea* pertencentes ao filo *Thaumarchaeota* (PAJARES; BOHANNAN, 2016).

Um estudo realizado em solos agrícolas mostra que um fator que diferencia os nichos de AOA e AOB no solo é o pH, sendo que AOA tem preferência por pH ácido (PEREIRA E SILVA et al., 2012). Além disso, baixas concentrações de amônia e baixa concentração de N orgânico no solo favorecem a maior abundância de AOA (WESSÉN et al., 2010; ERGUDER et al., 2009). Em comparação aos sistemas de colheita cana crua e cana queimada, foi encontrada diferença significativa na comunidade de AOB (RACHID et al., 2012).

Como a nitrificação é estritamente aeróbica, a compactação do solo que reduz a disponibilidade de O_2 pode afetar consideravelmente essa etapa. Segundo a revisão realizada por PAJARES e BOHANNAN (2016), a população de AOA parece persistir melhor em condições de baixa disponibilidade de O_2 . Além disso, AOA reagem mais rápido do que AOB em condições de alternância de condições aeróbicas/anaeróbicas. Um trabalho realizado com seis cortes sucessivos de cana-de-açúcar no sistema de colheita mecanizada mostrou alteração da atividade nitrificante (PUPIN, 2008). Outro trabalho interessante que merece destaque avaliou a abundância e a diversidade do gene *amoA* para AOA e AOB em pastagem intensiva em 3 diferentes níveis de impacto do animal no solo, indicando que em áreas sem impacto AOA dominou em relação a AOB, e no impacto mais intenso

AOB se tornou dominante; entretanto em relação a diversidade, AOB foi maior no impacto mais intenso, e a diversidade de AOA a menor (RADL et al., 2014).

2.4.3. Desnitrificação

A desnitrificação é uma via de respiração anaeróbica dos microrganismos que utilizam a redução do nitrato (NO_3^-) para N_2 , apresentando várias vias intermediárias com produção de NO e N_2O . Essa etapa do ciclo do nitrogênio é um processo biológico que retorna o N fixado no solo para a atmosfera (BRADY; WEIL, 2013).

Os principais marcadores moleculares utilizados para o estudo desse processo são os genes que codificam enzimas envolvidas em cada etapa da desnitrificação, como *nirK* e *nirS* que codificam dois tipos de nitrito redutase; *norB* que codifica a oxido nítrico redutase; e *nosZ* que codifica a oxido nitroso redutase (HENRY et al., 2006; KANDELER et al., 2006; SMITH et al., 2007; YU et al., 2014). Recentemente, um estudo identificou um gene *nosZ* atípico, presente em microrganismos não desnitrificantes mas que possuem a capacidade de reduzir o N_2O , conhecida por *nosZ* clado II. Assim como os desnitrificantes clássicos, que possuem o gene *nosZ*, esses microrganismos pertencentes ao clado II são bem diversos e bem difundidos no solo (JONES et al., 2013). Além disso, os autores relatam a importância ecológica desses microrganismos para diminuir a emissão de N_2O do solo.

A desnitrificação é principalmente realizada por bactérias heterotróficas aeróbicas facultativas, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Paraccocus* (PHILIPPOT et al., 2007). Isso significa que a desnitrificação ocorre quando a disponibilidade de oxigênio se torna limitada no solo, pois estes organismos preferem respirar O_2 na presença desse gás. Um estudo demonstrou que a umidade do solo é o principal fator que conduz a emissão de N_2O , sendo que as maiores emissões tem uma média de 70 a 80% dos poros preenchidos por água, consequentemente regula a disponibilidade do O_2 para a microbiota do solo (DAVIDSON et al., 2000).

Desse modo, sabemos que a compactação do solo está relacionada com a disponibilidade de oxigênio no solo, com isso, pode influenciar as taxas de desnitrificação. Entretanto, como o grupo de organismos desnitrificantes apresenta elevada redundância funcional, mudanças da estrutura da comunidade muitas vezes podem não estar correlacionadas com as alterações na taxa de desnitrificação (HALLIN et al., 2009). Apesar da emissão de N_2O ter sido 53 vezes maior no

tratamento do solo compactado comparado com o controle, não foram observadas mudanças na estrutura da comunidade de desnitrificantes (BAO et al., 2012).

Essa etapa é a mais estudada do ciclo do N devido à sua importância na emissão do N_2O , um dos gases do efeito estufa, com potencial de aquecimento global de 265 a 298 vezes maior do que a quantidade equivalente de CO_2 (IPCC, 2013).

Em cana-de-açúcar, comparado sistemas de manejo de cana crua e cana queimada obteve-se uma diferença significativa, através da análise de NMDS (MRPP < 0.05), nos organismos nitrificantes, acessados por meio do gene *nirK* (RACHID et al., 2012). Estudos realizados em áreas de cultivo de batata demonstraram que com a compactação do solo houve um predomínio de bactérias desnitrificantes e consequentemente o aumento da emissão de N_2O (RUSER et al., 2006). A compactação do solo provavelmente é responsável por criar um ambiente seletivo para as bactérias, sendo que a baixa porosidade do solo pode estar relacionada com os desnitrificantes acessados pelo gene *nirS* (PASTORELLI et al., 2013).

A compactação interfere negativamente na infiltração da água no solo. Desse modo, curtos períodos de solos alagados após chuvas podem se tornar mais frequentes. Recentemente, um estudo demonstrou que solos agrícolas alagados por curtos períodos afetam drasticamente a abundância, a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana que contém os genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* (WANG et al., 2017).

Desse modo, a estrutura e a funcionalidade da comunidade microbiana está diretamente relacionada com a dinâmica do ciclo do N. O levantamento da diversidade e do comportamento desses grupos funcionais microbianos em solos compactados é uma chave para entender mais um dos efeitos do aumento da densidade do solo sobre o funcionamento do sistema solo em cultivo.

3. HIPÓTESE

A alteração nas características físicas do solo cultivado com cana-de-açúcar, causado pelo maior tráfego agrícola, gera modificações no perfil da comunidade microbiana e uma redução na abundância de bactérias, fungos e arqueias. Como a compactação resulta em um ambiente em condições de anaerobiose, desse modo, espera-se um aumento na abundância dos genes relacionados a desnitrificação e da fixação biológica e uma redução na abundância dos genes relacionados com a etapa de nitrificação.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

Avaliar o efeito da alteração física do solo, proveniente dos diferentes tipos de manejo, na composição das comunidades microbianas, com destaque para aquelas que participam das transformações do nitrogênio em solos cultivados com cana-de-açúcar.

4.2. Objetivos específicos

De maneira mais detalhada pode-se listar como objetivos específicos realizados nesse projeto:

- Comparar a estrutura e a abundância da comunidade bacteriana, fúngica e de arqueias através da técnica de T-RFLP, DGGE e qPCR em dois solos cultivados com cana-de-açúcar, conduzidos com dois manejos;
- Comparar a estrutura da comunidade microbiana envolvidos no ciclo do N pelos genes marcadores (*amoA* e *nifH*), através da técnica de DGGE, em dois solos cultivados com cana-de-açúcar, conduzidos com dois manejos;
- Comparar a abundância da comunidade microbiana envolvidos no ciclo do N pelos genes marcadores (*amoA*, *nifH*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* e *nosZII*), através da técnica de qPCR, em dois solos cultivados com cana-de-açúcar, conduzidos com dois manejos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização das áreas experimentais

Esse projeto foi realizado em parceria com CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol). Foram coletados solos de duas áreas experimentais cultivadas com cana-de-açúcar (Figura 3). A primeira área está localizada no município de Quirinópolis – GO, na Usina Boa Vista, apresentando coordenadas geográficas 18° 32' S, 50° 26' O, altitude de 500 m e precipitação média anual de 1400 mm. A segunda área se localiza no município de Quatá-SP com coordenadas geográficas 22° 14' S, 50° 42' O, altitude de 540 m e precipitação média anual de 1280 mm. As duas regiões são classificadas por Köppen como clima tropical com estação seca no inverno (Aw).

Figura 3: Representação do mapa do Brasil, com ênfase na localização das áreas experimentais.

O principal motivo da escolha dessas áreas é a diferença de textura que os solos apresentam. Ambos são classificados como Latossolo Vermelho, solos de maior representatividade no território nacional, sendo que em Quirinópolis apresenta textura argilosa (Latossolo Vermelho Acriférico) e em Quatá apresenta textura arenosa (Latossolo Vermelho Álico). Dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 do item 6.1.

5.2. Descrição dos experimentos

Os experimentos foram instalados pelo grupo do CTBE em 2013, sendo que a colheita da cana-planta ocorreu em junho de 2014 e após um ano a colheita da primeira cana soca. As amostras de solo foram coletadas em dezembro de 2015 em Quirinópolis e janeiro de 2016 em Quatá.

As duas áreas experimentais apresentam a mesma variedade de cana-de-açúcar, RB96-6928, caracterizada como uma variedade precoce com rusticidade e boa produtividade, sendo uma das variedades mais plantadas nas últimas safras na região Centro-Sul do Brasil.

O delineamento experimental é em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada parcela é composta por 15 linhas de cana-de-açúcar com espaçamento de 1,5 m e 32 m de comprimento (Figura 4).

Figura 4: Delineamento experimental com as diferentes estratégias de manejo na colheita da cana-de-açúcar. PD: plantio direto, PDTR: plantio direto com tráfego reduzido.

Na área experimental foi realizado o plantio direto, ou seja, o manejo do solo para o preparo do plantio envolve apenas sulcação. Foram realizados dois métodos de colheita da cana-de-açúcar. No tratamento PD foi adotado o tráfego convencional de máquinas e equipamentos agrícolas da colheita mecanizada, enquanto que no tratamento PDTR o tráfego foi reduzido, simulando a utilização da estrutura de tráfego controlado com um maquinário que está sendo estudado e desenvolvido pelo CTBE. Esse maquinário apresenta uma bitola de 9 m, sendo assim, as linhas de tráfegos possuem 9 m de distância, resultando em área de tráfego de apenas 13% da área total. Além disso, foi adotado linhas permanentes de tráfego para reduzir os danos da compactação das entrelinhas sem tráfego. Em resumo, as parcelas da

simulação do tratamento PDTR possui uma colheita manual da cana-de-açúcar e com linhas fixas para tráfego do maquinário, sendo que as linhas de coletas de solo utilizadas para esse projeto foram as linhas que não tiveram tráfego da colhedora e dos transbordos.

Todas as parcelas experimentais dos tratamentos, PD e PDTR, tiveram a adubação de plantio, os tratos culturais e a quantidade de palha em superfície mantidas de formas idênticas.

5.3. Coletas de solo

Foram coletados nas entrelinhas de cada parcela experimental 3 sub-amostras para compor uma amostra de uma parcela nas profundidades de 0-10 cm, 10-20 cm e de 20-40 cm. Como o experimento em cada uma das áreas possui 4 repetições, foi obtido um total de 48 amostras sendo 24 amostras para a área de Quirinópolis e 24 amostras para área experimental de Quatá.

5.4. Atributos químicos e físicos dos solos coletados

As determinações do pH do solo (CaCl_2 0,01 mol.L⁻¹), fósforo disponível, cátions trocáveis (Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+), acidez potencial, CTC potencial e saturação de bases foram realizadas pela metodologia proposta por Raij et al., (2001).

Os atributos físicos considerados foram densidade, porosidade e resistência do solo à penetração, os quais foram quantificados por meio de coleta de amostras indeformadas de solo em anéis metálicos com dimensão de 0,05 m de diâmetro e 0,05 m de altura. As amostras foram coletadas na entrelinha de cultivo em cada uma das parcelas. A densidade e a porosidade as amostras de solo foram determinadas segundo metodologia EMBRAPA (2011). A resistência do solo à penetração foi obtida por um penetrômetro eletrônico de bancada, com ponteira de 4 mm e velocidade constante de penetração de 10 mm.s⁻¹. As leituras foram realizadas no centro do anel metálico. Foram descartadas as leituras de 1,0 cm da parte superior e inferior das amostras.

Os dados dos atributos químicos e físicos do solo foram realizados pelo grupo do CTBE e cedido para esse projeto com a finalidade de comparar com os atributos microbiológicos do solo.

5.5. Extração de DNA total do solo

Alíquotas de 0,4 g de solo de cada amostra foram submetidas à extração de DNA com o *kit* comercial *PowerSoil DNA Isolation* (MoBio, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O produto extraído foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, onde o DNA foi corado com GelRed (Biotium, EUA) e visualizado em luz ultravioleta.

5.6. Estrutura da comunidade de bactérias e fungos totais por T-RFLP

A técnica de T-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal) permite estudar a comunidade microbiana a partir da extração do DNA total das amostras ambientais. É uma metodologia conhecida como *fingerprint*, a qual analisa a estrutura da comunidade a partir de um perfil de produtos de amplificação por PCR que são diferenciados por restrição com endonucleases específicas destes fragmentos alvos (LIU et al., 1997).

Para a análise da estrutura da comunidade de bactérias, o DNA das amostras foi submetido à amplificação com os iniciadores específicos FAM-8FM (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 926R (5' CCGTCAATTCCTTTRAGTTT 3') (SCHÜTTE et al., 2009) com base do gene 16S de DNAr. A reação de amplificação foi realizada, com 1 µL da suspensão de DNA (aproximadamente 10 ng), 3,0 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, tampão 1X PCR e 0,04 U/ µL de Taq DNA polimerase, e volume final ajustado com água deionizada esterilizada para 50 µL. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 s, com uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, as amostras foram purificadas com a adição de 200 µL de isopropanol no produto de PCR obtido de 50 µL seguido de incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4.000 rpm por 1 hora e 30 min; descarte de sobrenadante; *spin* com a placa invertida; adição de 250 µL de etanol absoluto; centrifugação a 4.000 rpm por 1 hora e 30 min; *spin* com a placa invertida; descarte de sobrenadante e secagem das placas a 45°C por 15 min. O produto purificado foi então diluído em 25 µL de água esterilizada e quantificado em gel de agarose 2 %. Após a purificação, a próxima etapa realizada foi a adição

de enzimas de restrição, realizadas utilizando quantidades de aproximadamente 200 ng de produto de amplificação com 5 unidades de enzima endonuclease *HhaI* nas condições descritas pelo fabricante. E por fim, a última etapa de precipitação, na qual os produtos foram precipitados com acetato de sódio 3 M e EDTA 125 mM, seguido de uma adição de 50 µL de etanol absoluto e incubado por 15 min; centrifugação a 4.000 rpm por 30 min; *spin* com a placa invertida; descarte de sobrenadante; adição de 70 µL de etanol 70% e centrifugação a 4.000 rpm por 20 min. Posteriormente, os produtos foram diluídos em formamida *Hi-DI* com o marcador *LIZ 600* (Applied Biosystems) e analisados em um sequenciador *ABI3500* (Applied Biosystems).

Para a análise da estrutura da comunidade de fungos, o DNA das amostras foi submetido à amplificação com os iniciadores específicos de regiões ITS (*Internal Transcribed Sequences*) fúngicas FAM-ITS1F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATC 3'), com reação de amplificação realizada através de uma mistura contendo 1 µL da suspensão de DNA, 3,0 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 µM dos iniciadores, tampão 1X de PCR e 2,5 unidade de Taq DNA polimerase, sendo o volume completado com água deionizada esterilizada para 50 µL. As condições de termociclagem foram: 94°C por 1 min e 30 s; 13 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 55 s; 72°C por 45 s; 13 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 2 min; 72°C por 45 s; 9 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 3 min; 72°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 10 min (GARDES; BRUNS, 1993). Após a amplificação, foram realizadas as etapas de purificação, restrição e precipitação descritas acima. Para fungos, na etapa de restrição foi utilizada a enzima *HaeIII*.

5.7. Análise do T-RFLP

A leitura dos eletroferogramas foi realizada no programa GeneMapper® 4.1, considerando os parâmetros alelos, tamanho, altura e área dos picos, ajustados com o padrão GS 600 LIZ e diferenciando grupos ao nível de 0,5 par de base. Desse modo, foram obtidas matrizes que serviram de base estatística para as análises posteriores.

5.8. Estrutura da comunidade de arqueias e dos grupos AOA, AOB e *nifH* por PCR-DGGE

A técnica de DGGE (gel de eletroforese em gradiente desnaturante) também é uma metodologia de *fingerprint* que estuda a estrutura da comunidade a partir de um perfil de produtos de amplificação por PCR, mas são diferenciados a partir de alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C) presentes nas duplas fitas de DNA no fragmento amplificado (MUYZER et al., 1993).

5.8.1. Reação de amplificação do gene 16S DNAr de arqueias presentes no solo

Para o estudo da estrutura da comunidade de arqueias, o DNA das amostras foram amplificados utilizando os iniciadores específicos Arch21F (5' TTCYGGTTGATCCYGCCRGGA 3') e Arch958R (5' - YCCGGCGTTGANTCCAATT - 3') (MOYER et al., 1998). A reação de PCR foi realizada com 1 µL de DNA total, 2,5 µL de PCR tampão 1X, 3,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µL de dNTP (25 mM), 0,05 µL de BSA (10 mg.mL⁻¹), 0,1 µL de cada iniciador e 0,5 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), em volume final ajustado com água deionizada esterilizada para 25 µL. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 6 min. Posteriormente, 1µL do produto da primeira reação foi utilizado para realizar uma reação *NESTED-PCR* com os iniciadores Arch340F-GC (5' - GC grampo-CCCTACGGGGYGCASCAG - 3') e Arch519F (5' - TTACCGCGGCKGCTG - 3') (MOYER et al., 1998), foi utilizado as mesmas condições da reação de PCR e de termociclagem. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram de 937 pb para a primeira reação e de 179 pb para a segunda. Para a confirmação da amplificação dos produtos de PCR obtidos 5 µL foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%.

5.8.2. Reação de amplificação do gene *amoA* de AOA presentes no solo

Para o estudo da estrutura da comunidade de arqueias amônio oxidantes (AOA) foi utilizado o fragmento do gene *amoA*, o qual codifica a subunidade alfa da enzima

amônia monooxigenase, como marcador molecular. O DNA das amostras foram amplificados utilizando os iniciadores CrenamoA-23F (5' - ATGGTCTGGCTWAGACG - 3') e amoA-616R (5' - GCCATCCATCTGTATGTCCA - 3') (SAHAN; MUYZER, 2008). A reação de PCR foi feita com 1 µL de DNA total, 5 µL de PCR tampão 1X, 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µL de dNTP (25 mM), 1 µL de BSA (10 mg.ml⁻¹), 0,1 µL de cada iniciador e 0,5 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), volume completado com água deionizada esterilizada para 50 µl. As condições de amplificação foram: 5 min a 95°C; 10 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 55°C; 1 min a 72°C; 20 ciclos de 30 s a 92°C; 30 s a 55°C; 1 min a 72°C; e 10 min de 72°C de extensão final. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados foram de 624 pb. As amplificações foram previamente verificadas em gel de agarose 1,2% antes de serem submetidas à análise de DGGE.

5.8.3. Reação de amplificação da região do gene 16S DNAr de AOB presentes no solo

Para o estudo da estrutura da comunidade de bactérias amônio oxidantes (AOB) foi utilizado específico para a subdivisão β-proteobactéria a região do gene 16S DNAr como marcador molecular. O DNA das amostras foram amplificados utilizando os iniciadores CTO A/B (5' - GGAGRAAAGCAGGGGATCG - 3'), CTO C (5' - GGAGGAAAGTAGGGGATCG - 3') e CTO R (5' - CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC - 3') (KOWALCHUK et al., 1997). A reação de PCR foi feita com 1 µL de DNA total, 2,5 µL de PCR tampão 1X, 1,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP (25 mM), 0,5 µL de BSA (10 mg.ml⁻¹), 0,05 µL do iniciador CTO A/B, 0,025 µL do iniciador CTO C, 0,075 µL do iniciador CTO R e 0,1 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), volume completado com água deionizada esterilizada para 25 µL. As condições de amplificação foram: 1 min a 93°C; 35 ciclos de 30 s a 92°C; 1 min a 57°C; 45 s a 68°C; 5 min de 68°C de extensão final.

Posteriormente 1µL do produto da primeira reação foi utilizado para realizar uma reação *NESTED-PCR* com os iniciadores 341F-GC (5' - GC-grampo CCTACGGGAGGCAGCAG - 3') e 518R (5' - CCAGCAGCCGCGGTAAT - 3') (MUYZER et al., 1993). A reação de PCR foi feita com 1 µL de DNA total, 2,5 µL de PCR tampão 1X, 1,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP (25 mM), 0,5 µL de Formamida, 0,1 µL de cada iniciador e 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹),

volume completado com água deionizada esterilizada para 25 µL. As condições de termociclagem foram: 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 57°C; 30 s a 72°C; 30 min de 72°C de extensão final. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados foram de 170 pb. Para verificação o produto de PCR foi submetido ao gel de agarose 1,2%.

5.8.4. Reação de amplificação do gene *nifH* para diazotróficos presentes no solo

Para o estudo da estrutura da comunidade diazotrófica foi utilizado o gene *nifH*, o qual codifica a subunidade da enzima nitrogenase redutase, amplamente utilizado como marcador genético para estudo de diversidade e abundância de diazotróficos. O DNA das amostras foram amplificados utilizando os iniciadores FGHP19 (5' - ACGGCAARGGTGGNATHG - 3') (SIMONET et al., 1991) e POLR (5' - ATSGCCATCATYTCRCCGGA - 3') (POLY et al., 2001). A reação de PCR foi feita com 1 µL de DNA total, 5 µL de PCR tampão 1X, 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTP (25 mM), 0,1 µL de cada iniciador e 0,5 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL⁻¹), volume completado com água deionizada esterilizada para 50 µL. As condições de termociclagem foram: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 56°C; 2 min a 72°C; 30 min de 72°C de extensão final. Em seguida, 1µL do produto da primeira reação foi utilizado para realizar uma reação *NESTED-PCR* com os iniciadores POLF-GC (5' - GC-grampo TGCGAYCCSAARGCBGACTC - 3') e AQER (5' - GACGATGTAGATYTCCTG - 3') (POLY et al., 2001). Foram utilizadas as mesmas condições de reação de PCR e de termociclagem da amplificação anterior. O produto de PCR foi submetido ao gel de agarose 1,2% para verificação da amplificação do fragmento esperado.

5.9. Análise do DGGE

As análises de DGGE foram realizadas no aparelho *Ingeny PhorU2 System* (Ingeny, Goes, Holanda). A concentração do gradiente desnaturante do gel variou de acordo com o gene estudado, sendo que as soluções estoque utilizadas foram 0 e 80% desnaturantes, no qual 100% de desnaturação corresponde a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Para a análise da estrutura da comunidade de

arqueias foi utilizada a concentração de poliacrilamina (Acrilamida:Bis 37,5:1) a 8%, e as demais análises foram utilizados a concentração de 6%. Os gradientes desnaturantes de ureia e formamida utilizados foram de 30-55% para Arqueias, 15-55% para o grupo AOA, 35-70% para o grupo AOB e 45-65% para a comunidade diazotrófica.

Para a eletroforese, foram utilizados 16 µL dos produtos de PCR acrescidos com 5 µL de *Loading Buffer* 6x. A eletroforese foi realizada a 60°C e submetida a uma corrente de 90 volts durante 16 horas. Os géis foram corados com SYBR-green® (Invitrogen, Breda, The Netherlands), em TAE 0,5x, por 20 min na ausência de luz e escaneados em Storm 845: New Phosphorimager/Gel Scanner.

Cada amostra formou um perfil de bandas no gel de DGGE, sendo que cada banda corresponde a distintos grupos microbianos com determinada concentração de bases de GC. Os perfis de bandas nas imagens digitais dos géis de DGGE foram analisados pelo programa BioNumerics 5.10 (Applied Maths NV), o qual gerou matrizes de dados com valores de intensidade e ausência e presença de bandas. Essas matrizes serviram de base estatística para as análises posteriores.

5.10. Análise estatística dos dados de T-RFLP e do DGGE

As matrizes de dados geradas, tanto pelo T-RFLP ou pelo DGGE, foram analisadas no programa estatístico PAST 2.17c (Copyright Hammer and Harper 1999-2013) e no R 3.3.2 (Copyright 2009-2016 The R Foundation for Statistical Computing) utilizando o pacote *Vegan*.

Os métodos de análise de dados utilizado foi a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizado em ecologia para análise de beta-diversidade devido a preservação de qualquer distância relativa entre os dados amostrados. E a Análise de Similaridade (ANOSIM), um método não paramétrico de análise multivariada muito utilizada em ecologia de comunidades. O teste de ANOSIM gera um valor R que varia de 0 a 1,0, sendo que valores acima de 0,75 indicam forte separação dos grupos amostrais.

5.11. Quantificação das comunidades alvo por PCR em tempo real

A técnica de PCR quantitativo (qPCR) permite quantificar a amplificação dos fragmentos alvos de estudo ao longo dos ciclos de amplificação, e assim resulta em valores de número de cópias do gene por grama de solo amostrado em cada ambiente.

O qPCR foi realizado com o uso do equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Todas as reações de amplificação utilizaram 10 µL do marcador fluorescente SYBR-green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems®), 0,5 µL de BSA (20 mg.ml⁻¹), 1 µL de DNA, mais iniciadores específicos do gene alvo e água deionizada e destilada, totalizando as reações em um volume de 20 µL.

A construção das curvas padrões para cada gene a ser quantificado foi realizada com a clonagem do fragmento alvo em plasmídeos utilizando o *kit pGEM-T Easy* (Promega). Após a confirmação do inserto no plasmídeo por PCR usando iniciadores específicos, foi feita diluição seriada 1:10 com a obtenção de cinco pontos em triplicatas. Apenas a curva padrão de fungos e bactérias totais foram obtidas por meio de diluição seriada de 1:10 de amplificações do DNA molde com número de cópias conhecidas. A eficiência do qPCR foi calculada de acordo com a equação $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$.

Para a quantificação das amostras do DNA extraído do solo, os dados da amplificação foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse.

A confirmação da amplificação dos produtos foi verificada através da análise da curva de *melting* e pelo tamanho esperado do fragmento amplificado no gel de agarose 1,5%.

5.11.1. Reações de quantificação da comunidade microbiana do solo

Para quantificar os grupos de bactérias totais presentes no solo foram usados 0,8 µM de cada iniciador FP 16S (5' - GG TAGTCYAYGCMSTAAACG - 3') e RP 16S (5' - GACARCCATGCASCACCTG - 3') (BACH et al., 2002). A condição de ciclagem foi um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos de amplificação 95°C por 27 s, 62°C por 60 s e 72°C por 30 s. A eficiência da curva padrão obtida foi de 106% com diluições de 10² a 10⁷.

Na quantificação dos fungos totais foram utilizados 0,4 µM dos iniciadores ITS1F (5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3') e 5.8S (5' - CGCTGCGTTCTTCATCG - 3') foram utilizados para os grupos de fungos. A condição de ciclagem foi um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de amplificação 95°C por 30 s, 53°C por 30s e 72°C por 1 min, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 45 s (FIERER et al., 2005; RASCHE et al., 2010). A eficiência da curva padrão obtida foi de 102% realizada com diluições de 10^1 a 10^6 .

E os grupos de arqueias totais foram quantificados pela utilização dos iniciadores Arch787F (5'- ATTAGATACCCSBGTAGTCC - 3') combinado com o primer Arch958R (5' - YCCGGCGTTGANTCCAATT - 3') (DELONG, 1992) na concentração de 0,8 µM. Numa reação com ciclos de 95°C por 30 s, seguidos de 60°C por 1 min. A eficiência da curva padrão foi de 95% realizada com diluições de 10^2 a 10^7 .

5.11.2. Reações de quantificação de organismos nitrificantes

Os organismos nitrificantes estudados foram arqueias e bactérias oxidadoras de amônio. Para os grupos de AOA foi usado 0,2 µM de cada iniciador amo23F (3' - ATGGTCTGGCTWAGACG - 5') (TOURNA et al., 2008) e uma versão degenerada do crenamoA616r (5' - GCCATCCABCKRTANGTCCA - 3') (NICOL et al., 2008). A condição de ciclagem foi um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos de amplificação 94°C por 45 s, 50°C por 45 s e 72°C por 45 s. E para os grupos de AOB utilizou 0,25 µM do par de iniciadores (1:10) amoA-1F (3' - GGGGTTTCTACTGGTGGT - 5') (STEPHEN et al., 1999) e amoA-2R (3' - CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC - 5') (ROTTHAUWE et al., 1997). Sendo as condições de um ciclo de 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos de amplificação 94°C por 60 s, 60°C por 60 s e 72°C por 60 s.

Foi obtido uma eficiência de 83% para AOA e a curva padrão realizada com diluições de 10^4 a 10^8 . Para AOB a eficiência foi de 99% e a curva realizada com diluições de 10^2 a 10^8 .

5.11.3. Reação de quantificação de organismos fixadores de N

O gene marcador utilizado foi o *nifH* que codifica uma subunidade da enzima nitrogenase redutase. O conjunto de os iniciadores foi FGHP19 (5' - ACGGCAARGGTGGNATHG - 3') (SIMONET et al., 1991) e POLR (5' - ATSGCCATCATYTCRCCGGA - 3') (POLY et al., 2001), na concentração 1,6 μ M cada. Foi submetido a uma ciclagem inicial de 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos de amplificação 94°C por 60 s, 55°C por 27 s e 72°C por 60 s. A eficiência da curva padrão foi de 90% com diluições de 10^4 a 10^8 .

5.11.4. Reações de quantificação de organismos desnitrificantes

Para o estudo da abundância dos organismos desnitrificantes foram utilizados quatro genes marcadores: *nirK*, *nirS*, *nosZ* e *nosZII*.

Para o primeiro gene marcador o conjunto de iniciadores utilizados foi nirK867 (5' - ATYGGCGGVAYGGCGA - 3') (HENRY et al., 2004) e nirK5R (3' - GCCTCGATCAGRTTTRTGG - 5') (BRAKER et al., 1998), adicionaram-se 0,3 μ M de cada iniciador. A condição de termociclagem foi de um ciclo inicial de 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos 95°C por 15 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30s. A eficiência da curva obtida foi de 99% com diluições de 10^3 a 10^9 .

Outro conjunto de iniciadores utilizado, 0,3 μ M de cada iniciador, foi nirS cd3af (5' - GTNAAAYGTNAARGARACNGG - 3') (MICHOTEY et al., 2000) e nirS R3cd (5' - GASTTC GGRTGSGTCTTGA - 3') (THROBACK et al., 2004). As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 95°C por 10 min seguido de 39 ciclos 95°C por 30 s, 57°C por 60 s e 72°C por 45 s. Com diluições de 10^3 a 10^9 , a eficiência da curva obtida foi de 98%.

Para a quantificação do gene *nosZ* clado I foi usado os iniciadores nosZ2F (5' - CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT - 3') e nosZ2R (5' - CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA - 3') (HENRY et al, 2006), com concentração de 1,0 μ M de cada iniciador. Sendo as condições de um ciclo a 95°C por 10 min e 39 ciclos 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Foi obtida uma eficiência de 98% da curva padrão com diluições de 10^3 a 10^7 .

E por fim, outro conjunto de iniciadores utilizados foi *nosZ* clado II [nosZ-II-F (5' - CTIGGICCIYTKCAYAC - 3') e nosZ-II-R (5' - GCIGARCARAAITCBGTRC -3')]

(JONES et al, 2013), sendo 2,0 μ M de cada iniciador. O ciclo realizado foi um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min e 39 ciclos de amplificação 95°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 45 s. Com diluições de 10^1 a 10^7 foi obtida uma eficiência de 107% da curva padrão.

5.12. Análise dos dados de qPCR

A quantificação do gene de interesse é calculada a partir da comparação dos valores de Ct obtidos na amplificação do DNA extraído do solo com os valores de Ct da curva padrão, resultando no logaritmo do número de cópias do gene em estudo por grama de solo.

Os dados gerados foram analisados no programa estatístico R 3.3.2 (Copyright 2009-2016 The R Foundation for Statistical Computing) utilizando o pacote *Laercio*. No teste de comparação de média entre os dois tratamentos por cada profundidade utilizamos ANOVA seguido do Teste de TUKEY HSD.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização química e física dos solos

Na área de coleta de Quirinópolis/GO o solo foi classificado como Latossolo Vermelho Acriférico, enquanto o solo na área de Quatá/SP como Latossolo Vermelho Álico. As características químicas de ambos os solos estão apresentadas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização química do solo das áreas experimentais de Quirinópolis/GO e de Quatá/SP após a segunda colheita de cana-de-açúcar.

Prof	pH	MO	V	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC
cm	CaCl ₂	g.dm ⁻³	%	mg.dm ⁻³			mmolc.dm ⁻³			
Quirinópolis/GO										
0 - 5	4,8	43,0	64,5	8,0	3,7	35,8	13,8	29,8	53,2	83,0
5 - 10	4,9	40,0	55,3	6,8	2,7	30,5	10,8	36,0	44,0	80,0
10 - 20	5,1	38,0	61,8	6,5	3,9	32,3	12,3	30,8	48,4	79,1
20 - 40	5,4	27,3	60,0	4,3	2,4	24,5	10,8	25,3	37,7	62,9
Quatá/SP										
0 - 5	5,3	13,0	71,5	19,3	1,0	22,0	10,8	13,5	33,7	47,2
5 - 10	5,5	8,8	60,3	11,8	0,7	16,3	6,5	15,8	23,5	39,2
10 - 20	5,2	7,3	58,0	8,8	1,2	17,3	7,0	17,0	25,4	42,4
20 - 40	4,6	6,5	39,8	15,8	0,9	10,5	3,8	24,0	15,1	39,1

V: Saturação de Bases, SB: Soma de Bases, CTC: Capacidade de Troca de Cátions.

Em relação as análises físicas do solo, podemos observar que na área de Quirinópolis/GO a porcentagem de argila, areia e silte corresponde à 56, 25 e 19%, respectivamente, classificado como solo de textura argilosa (EMBRAPA, 2006) (Tabela 2).

Tabela 2: Análises físicas do solo da área experimental de Quirinópolis/GO após a segunda colheita nas parcelas PD e PDTR.

Trat	Prof	Areia	Argila	Silte	Ds	PT	Macro	Micro	RP
	cm		g.kg ⁻¹		g.cm ⁻³		m ³ .m ⁻³		MPa
PD	0 -10	267	547	186	1,43	0,63	0,18	0,45	2,22
	10 - 20	249	561	190	1,31	0,64	0,21	0,43	1,09
	20 - 40	225	580	195	1,23	0,64	0,22	0,42	0,61
	0 -10	267	547	186	1,33	0,64	0,20	0,44	0,67
PDTR	10 - 20	249	561	190	1,37	0,64	0,18	0,46	1,53
	20 - 40	225	580	195	1,29	0,64	0,20	0,44	0,83

Ds: Densidade do solo, PT: Porosidade Total, RP: Resistência à penetração.

A maior valor obtido de densidade do solo (D_s) foi de $1,43 \text{ g.cm}^{-3}$, na camada de 0 a 10 cm, no tratamento que houve o tráfego de colheita (PD). No tratamento onde não houve tráfego (PDTR), a densidade foi de $1,33 \text{ g.cm}^{-3}$. Nas parcelas com tráfego (PD) a D_s reduz ao longo do perfil do solo, enquanto que nas parcelas sem tráfego do maquinário este valor se distribuí de forma mais homogênea ao longo do perfil (Tabela 2). As menores D_s são observadas na camada de 20 a 40 cm de solo. No tratamento de PDTR o maior valor de densidade ($1,37 \text{ g.cm}^{-3}$) encontra-se na camada 10 a 20 cm do solo, resultado também encontrado em outros trabalhos com Latossolo Vermelho em áreas de cana-de-açúcar (BAQUERO et al., 2012; TAVARES FILHO et al., 2010). Não houve diferença significativa nos valores de densidade do solo entre os tratamentos, utilizando os testes estatísticos de comparação de médias ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

As D_s média esperadas de solos argilosos variam de 1,0 a $1,2 \text{ g.cm}^{-3}$ (CAMARGO; ALLEONI, 1997). Em solos argilosos, uma D_s a partir de $1,45 \text{ g.cm}^{-3}$ pode acarretar na restrição radicular da planta (REINERT et al., 2001). Os maiores valores de D_s foram encontrados na camada mais superficial, sendo esse resultado esperado pois essa camada é a que recebe impacto direto das rodas do maquinário (LOZANO et al., 2013). Podemos notar que a camada superficial com tráfego de maquinários (PD) apresenta o valor de D_s ($1,43 \text{ g.cm}^{-3}$) bem próximo ao limite crítico considerado.

Estudos realizados em Latossolo Vermelho de textura argilosa, comparando um fragmento de floresta (área controle) com áreas de cana queimada e de cana mecanizada, encontraram uma D_s na área controle de $0,96 \text{ g.cm}^{-3}$ comparado com a D_s de $1,25 \text{ g.cm}^{-3}$ para área de cana queimada e de $1,31 \text{ g.cm}^{-3}$ para área de cana com colheita mecanizada (RACHID et al., 2012). Desse modo, podemos dizer que em ambos os tratamentos (queima e colheita mecanizada) há uma maior tendência de compactação. As áreas utilizadas no nosso experimento são cultivadas com cana-de-açúcar e colhidas de forma mecanizada por anos consecutivos. Ou seja, com apenas dois anos a mais de tráfego intenso (início da montagem experimental) no tratamento PD foi possível notar um aumento de 7,5% da D_s na camada superficial em comparação com o tratamento PDTR, onde ocorreu a interrupção desse manejo.

A porosidade total não teve variação ao longo do perfil e nem diferença entre os tratamentos, predominando o valor de $0,64 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$ (Tabela 2). Em solos argilosos, a

porosidade total variou de 0,40 a 0,65 $\text{m}^3.\text{m}^{-3}$ (PREVEDELLO; ARMINDO, 2015). Essa característica física do solo já foi descrita como pouco responsiva a alterações em direções horizontais no solo em diferentes tratamentos, indicando que o tráfego de maquinário agrícola nas entrelinhas não tem efeito sobre essa propriedade física do solo (OTTO et al., 2011). Em relação a macroporosidade, os valores ficaram em cerca de 0,20 $\text{m}^3.\text{m}^{-3}$. Esperava-se encontrar um menor valor para o tratamento que teve tráfego na colheita (PD), porém não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Outro índice de compactação, além da D_s , é a resistência a penetração (RP) (ABU-HAMDEH et al., 2003). A RP é considerada um parâmetro útil para avaliação da qualidade física do solo para o crescimento de raízes de plantas (LETEY, 1985). O maior valor de RP (2,22 MPa) foi encontrado na camada de 0 a 10 cm no tratamento com tráfego na colheita (PD) em contraste com o valor de 0,67 MPa do tratamento sem tráfego na colheita (PDTR) (Tabela 2), sendo essa diferença significativa quando avaliada na estatística de comparação de médias ANOVA e Tukey HSD (valor de significância a 95%). As demais camadas, 10 a 20 e 20 a 40 cm, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3). Os perfis de cada tratamento seguiram o mesmo comportamento observado nos resultados de D_s (Tabela 2), ou seja, a RP acompanha o mesmo perfil da D_s , também observado em trabalhos realizados com canaviais cultivados em Latossolo Vermelho (OTTO et al., 2011; BAQUERO et al., 2012).

Um trabalho realizado em Latossolo Vermelho de textura média relatou que valores de RP inferiores à 0,75 MPa não afetam o crescimento da raiz da cana-de-açúcar. Porém, quando os valores se encontram entre 0,75 e 2,0 MPa o crescimento radicular é significativamente reduzido. Além disso, este estudo mostrou que valores acima de 2,0 MPa restringe significativamente o crescimento radicular (OTTO et al., 2011). Outro aspecto que merece destaque deste trabalho é que a RP do solo é um fator mais sensível aos efeitos do tráfego de máquinas do que a D_s .

Outro trabalho realizado em Latossolo Vermelho de textura muito argilosa observou que quanto maior número de colheita mecanizada de cana na área, maior é a variação da RP (BAQUERO et al., 2012). Sendo assim, podemos notar que a camada superficial com tráfego de maquinários (PD) apresenta o valor de RP (2,22 MPa), superior ao limite crítico considerado de restrição do crescimento radicular.

Nesse caso, ao analisar o conjunto de índices de compactação, tanto a Ds quanto a RP nos mostram que o tratamento PD tende a ser mais compactado que o PDTR.

Em relação a área de Quatá/SP notamos mais de 80% da composição do solo é constituída por grânulos de areia, seguidos de uma variação de 9 a 14% de argila. Sendo assim, o solo dessa área é classificado como solo de textura arenosa (EMBRAPA, 2006) (Tabela 3).

Tabela 3: Análises físicas do solo da área experimental de Quatá/SP após a segunda colheita nas parcelas PD e PDTR.

Trat	Prof	Areia	Argila	Silte	Ds	PT	Macro	Micro	RP
	cm	g.kg ⁻¹			g.cm ⁻³	m ³ .m ⁻³			MPa
PD	0 - 10	853	87	60	1,72	0,61	0,41	0,20	1,47
	10 - 20	832	108	60	1,80	0,59	0,39	0,20	1,33
	20 - 40	801	142	57	1,91	0,55	0,34	0,21	2,82
PDTR	0 - 10	853	87	60	1,70	0,62	0,41	0,23	0,58
	10 - 20	832	108	60	1,80	0,59	0,36	0,23	1,39
	20 - 40	801	142	57	1,85	0,57	0,34	0,23	1,85

Ds: Densidade do solo, PT: Porosidade Total, RP: Resistência à penetração.

Os maiores valores de Ds foram encontrados nas camadas de 20 a 40 cm, com valores de 1,91 e 1,85 g.cm⁻³ nos tratamentos PD e PDTR respectivamente. Além disso, ao longo do perfil de cada tratamento a Ds é crescente, ou seja, os menores valores foram encontrados na superfície do solo (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizando os testes estatísticos de comparação de médias ANOVA e Tukey HSD com o nível de significância em 95%.

A Ds média encontrada em solos de textura arenosa é de 1,20 a 1,40 g.cm⁻³ (CAMARGO; ALLEONI, 1997). No entanto, outros autores afirmam que a variação normal pode ocorrer até 1,80 g.cm⁻³ (ALBERTIN; KARDOS, 1965; BRADY; WEIL, 2013). A Ds se torna crítica ao crescimento das raízes quando atinge valores acima de 1,65 g.cm⁻³ (REINERT et al., 2001). Uma observação importante é que baseado na literatura, esperava-se encontrar maiores valores de Ds na camada superficial quando comparada das camadas mais profundas, mas o resultado não confirmou esta expectativa.

Alguns trabalhos encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados, em que o maior valor de Ds foi encontrado na camada subsuperficial do solo, e discutem

a possibilidade da camada de palhada de cana-de-açúcar deixada sobre o solo pode ter aliviado a compressão do solo causada pelos maquinários na camada superficial (OTTO et al., 2011). Outro ponto a ser considerado diz respeito a densidade da raiz, visto que a densidade de raiz ocupa uma área considerável na superfície do solo, reduzindo assim a superfície de compactação na camada de 0 a 10 cm (SOANE, 1990). Embora realizando plantio direto também no solo argiloso não observamos esse fato.

Estudos realizados em Latossolo Vermelho de textura arenosa obtiveram uma D_s na área controle (floresta nativa) de $1,20 \text{ g.cm}^{-3}$ e uma D_s de $1,61 \text{ g.cm}^{-3}$ para área de cana-de-açúcar. Mesmo apresentando valores superiores ao valor crítico, neste caso os valores de densidade não podem ser considerados como um indicativo de alta compactação do solo, pois através da análise conjunta de todos os resultados obtidos indicou que a D_s possivelmente não interferiu na restrição do crescimento radicular, ou qualquer problema relacionado com infiltração de água no solo ou restrição de atividade biológica (TAVARES FILHO et al., 2010).

Analisando os resultados obtidos de D_s , notamos que todos os valores se encontram acima do valor crítico considerado ($1,65 \text{ g.cm}^{-3}$). Entretanto, medidas isoladas da D_s não podem explicar como as propriedades físicas do solo afetam o crescimento radicular (VOORHEES, 1992).

Em relação a porosidade total do solo, o comportamento dos valores foi inversamente proporcional aos da D_s (Tabela 3). Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos [testes estatísticos de comparação de médias ANOVA e Tukey HSD (valor de $p > 0.05$)]. Os valores de macroporosidade foram similares para ambos os tratamentos na camada de 0 a 10 cm ($0,41 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$) e valores bem próximos das demais camadas em comparação PD e PDTR, sem diferença significativa entre eles. Um estudo realizado em Latossolo Vermelho de textura arenosa (0 a 20 cm) demonstrou que não houve diferença na porosidade total em comparação de solo sob vegetação nativa (aproximadamente $0,55 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$) em relação a diferentes culturas agrícolas, entre elas a cana-de-açúcar ($0,40 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$). Entretanto, foi observada diferença significativa na macroporosidade entre o ambiente florestal (aproximadamente $0,40 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$) e em solos do canavial ($0,20 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$) (TAVARES FILHO et al., 2010).

Os valores de RP na camada de 0 a 10 cm foram os que apresentaram maior contraste, sendo 1,47 e 0,58 MPa para os tratamentos PD e PDTR respectivamente,

sendo essa diferença significativa [testes estatísticos de comparação de médias ANOVA e Tukey HSD (valor de $p > 0.05$)] (Tabela 3). As demais camadas subsuperficiais não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). Apesar dos valores da camada de 20 a 40 cm não serem próximos (PD: 2,82 MPa e PDTR: 1,85 MPa), a variabilidade das repetições amostradas foram altas, resultando na ausência de diferença estatística (Figura 5). Em relação as profundidades de cada tratamento, foi observado o mesmo comportamento dos resultados da Ds, sendo que o maior valor foi encontrado na camada 20 a 40 cm com tráfego de máquinas (PD).

Em solos arenosos, o valor crítico considerado para a RP do solo é entre 6,0 a 7,0 MPa (SENE et al., 1985). Estudos em Latossolo Vermelho de textura arenosa demonstraram que houve diferença na RP entre solo sob vegetação de floresta nativa e entre três culturas agrícolas (pastagens, cana-de-açúcar e culturas anuais). Entre as culturas não houveram diferenças significativas. Comparando o solo controle sob floresta (1,22 MPa) e o solo sob cultura da cana (5,52 MPa), ocorreu um aumento de 4,30 MPa (TAVARES FILHO et al., 2010). Com isso, podemos notar que apesar da diferença significativa da RP na camada de 0 a 10 cm, os valores são muito inferiores ao limite de impedimento do crescimento do sistema radicular, mesmo o maior valor encontrado subsuperfície (2,82 MPa) não atinge nem metade do valor crítico considerado. Ou seja, nessa área apesar da Ds estar acima do valor crítico considerado ($1,65 \text{ g.cm}^{-3}$), a RP mostra que não deve haver restrição ao desenvolvimento radicular das plantas nestes solos, o que reitera a importância de analisar o conjunto de dados.

Figura 5: Variação da resistência a penetração entre os tratamentos PD e PDTR nas camadas de 0-10 cm, 10-20 cm e 20-40 cm. Em cima solo argiloso e embaixo solo arenoso. A comparação de médias foi feita com teste ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

A partir dessa primeira análise, que avalia o impacto nos parâmetros físicos do solo sobre os tratamentos com e sem tráfego de maquinários na colheita (PD e PDTR), notamos que apenas a camada superficial de 0 a 10 cm apresentou diferença significativa de RP. Com isso, todo trabalho posterior foi focado na primeira camada do solo, com o objetivo de observar como a alteração física do solo pode modificar a comunidade microbiana. Os resultados obtidos das outras camadas dos solos estão apresentados nos anexos A ao I.

6.2. Análise da Comunidade Microbiana

Foi realizado o estudo dos três grandes grupos da comunidade microbiana: bactérias, fungos e arqueias. Esse estudo compreende a análise da estrutura das comunidades (por DGGE ou T-RFLP) e abundância (por qPCR) desses grupos microbianos. Além disso, foram analisadas comunidades microbianas associadas ao

ciclo do nitrogênio, devido a sua capacidade responsiva a modificações de parâmetros do solo que podem indicar alterações em sua qualidade.

6.2.1. Análise da estrutura da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade microbiana, descrita por DGGE ou T-RFLP, foi comparada entre os tratamentos por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Para buscar uma melhor compreensão da relação dos tratamentos com os parâmetros físicos do solo, as variáveis Ds e RP foram representadas por vetores na PCoA, indicando se esses parâmetros estão contribuindo ou não para o agrupamento das amostras nos tratamentos. A importância relativa de cada variável foi estimada através da projeção perpendicular com cada amostra.

Na análise da comunidade bacteriana das amostras de solo argiloso ocorreu uma distinção no padrão de distribuição das amostras em relação aos diferentes tratamentos (PD x PDTR) (ANOSIM R: 1.0, valor de p: 0.032) (Figura 6a). No solo arenoso observamos também a formação de dois grupos, porém houve uma alta sobreposição entre os tratamentos PD e PDTR (ANOSIM R: 0.43, valor de p: 0.031) (Figura 6b).

O grupo de arqueias apresentou o mesmo padrão de diferenciação observado para o grupo de bactérias. No solo argiloso temos uma separação total das amostras em relação a cada tratamento (ANOSIM R: 0.74, valor de p: 0.025), e no solo arenoso também é possível identificar dois grupos apresentando uma alta sobreposição entre as amostras (ANOSIM R: 0.31, valor de p: 0.032) (Figura 6e e f).

A análise da estrutura da comunidade dos fungos mostrou que não há separação das amostras por tratamento e nem correlação com os parâmetros físicos do solo, independentemente do tipo de textura do solo (ANOSIM R < 0.05, valor de p > 0.3) (Figura 6c and d).

Figura 6: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) relacionadas com RP (Resistência a penetração) e DS (Densidade do solo) nos dois tratamentos PD e PDTR na camada de 0 a 10 cm. a), c) e e) estrutura da comunidade microbiana no solo argiloso. b), d) e f) estrutura da comunidade microbiana no solo arenoso.

Trabalhos realizados que realizaram a comparação de colheita da cana crua e cana queimada mostraram que no primeiro ano da mudança de colheita não foi possível observar a diferenciação dos grupos da comunidade bacteriana do solo (AZEVEDO et al., 2015), entretanto, após seis anos consecutivos do cultivo com a cana crua houve uma diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana no solo (RACHID et al., 2012). Além disso, esse último trabalho citado relata que um dos fatores responsáveis pela organização diferenciada da comunidade bacteriana entre os diferentes manejos foi a Ds.

Outro trabalho realizado com várias áreas produtoras de cana-de-açúcar mostrou que a estrutura da comunidade bacteriana em solos agrícolas é modulada pelas alterações de fatores químicos e de manejo, o que os autores se referem como interferência antropogênica (DURRER et al., 2017). Nossos dados relatam que houve diferença significativa na estrutura da comunidade bacteriana com apenas dois anos de interrupção do tráfego intenso de maquinários, sendo essas mudanças correlacionadas positivamente com atributos físicos do solo, mostrando relação com resultados obtidos em trabalhos anteriores.

Em relação ao perfil de comunidade de arqueias em cana-de-açúcar, foi relatado que nas análises de T-RFLP um dos principais fatores que explicam a separação dos grupos de áreas produtoras são as práticas de manejo (BIGATON, 2014). Ou seja, o resultado mostrado no presente estudo correlaciona com o trabalho anteriormente citado, por ser um grupo responsivo a alteração ambiental.

A estrutura da comunidade fúngica não apresentou diferença entre os tratamentos e nem correlações positivas com os aspectos físicos do solo. A baixa responsividade da comunidade fúngica pode ser uma característica inerente ao grupo, ou mesmo pode ser explicada pela limitação de dispersão destes (associada com a biogeografia desse grupo) (GUMIERE et al., 2016).

6.2.2. Análise da abundância das comunidades microbianas

A análise de abundância de genes marcadores da microbiota do solo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, independente do tipo de textura do solo. No solo argiloso, as arqueias foram mais abundantes com aproximadamente 10,1 (log do número de cópias por grama de solo) nos tratamentos PD e PDTR. Em seguida, as bactérias com 9,9 no PD e 10,0 no PDTR.

A abundância dos fungos foi determinada em aproximadamente 6,8 para ambos os tratamentos. No solo arenoso, a abundância de bactérias e arqueias foram bem similares com a variação entre os tratamentos de 9,6 a 9,8 (Figura 7).

Em relação a abundância de bactérias em solos cultivados com cana-de-açúcar, a variação entre as áreas produtoras foi de 8,1 a 10,6, também não encontrando correlação significativa na quantificação do 16S DNAr com propriedades físicas e químicas do solo (DURRER et al., 2017). Considerando a diferença no manejo da cana-de-açúcar, comparando a colheita da cana crua com a cana queimada, também não houve diferença significativa da abundância da comunidade bacteriana entre os manejos (RACHID et al., 2013).

A variação significativa de abundância de bactérias foi encontrada apenas quando comparada com outras culturas, como exemplo floresta nativa, pastagem e soja (LAMMEL et al., 2015). Esse último trabalho citado foi realizado em um Latossolo Vermelho de textura argilosa e também apresentou maior abundância de arqueias em relação a bactérias na cultura da soja, sendo o pH um fator que interferiu negativamente na abundância de bactérias no solo.

A quantificação do gene 18S DNAr de fungo foi realizada em diferentes áreas produtoras de cana-de-açúcar teve uma variação média de 5,0 a 6,0 (log do número de cópias por grama de solo) (GUMIERE et al., 2016). A abundância em floresta nativa e pastagem foi entorno de 6,7 e para soja e 5,2 (LAMMEL et al., 2015). Esses valores correspondem com os valores encontrados nesse estudo.

Em relação a abundância do gene 16S DNAr de arqueias, dominância de arqueias em solos agrícolas sobre o cultivo de soja já foi apontada. Segundo Lammel et al. (2015), muitos aspectos do manejo agrícola podem ter levado a supressão da abundância de fungos e bactérias, como a modificação das propriedades químicas do solo por meio da fertilização e da aplicação de pesticidas, sendo esses fatores responsáveis pela seleção diferenciada das arqueias nesse ambiente. E em áreas agrícolas de canaviais também já foi registrado a maior quantificação de arqueias em relação a bactérias (BIGATON, 2014).

Figura 7: Quantificação dos genes marcadores dos grupos de bactéria, fungo e arqueia no solo na camada de 0 a 10 cm. Os valores expressos em logaritmo do número de cópias por grama de solo representam as médias de três repetições e as barras o desvio padrão. Letras minúsculas representam a comparação entre tratamentos de cada grupo microbiano. A comparação de médias foi feita com teste ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

6.3. Comunidades associadas ao ciclo do nitrogênio

6.3.1. Análise da composição de microrganismos nitrificantes

A estrutura da comunidade e a quantificação dos microrganismos oxidadores de amônia foram realizados através do gene marcador *amoA*, referente a enzima amônia monooxidase. Pela análise da PCoA, nota-se que ocorreu a formação de distintos grupos na comunidade de AOA correlacionados à intensidade do tráfego de máquinas na área amostrada. Essa separação ocorreu tanto para as amostras com solo argiloso (ANOSIM R: 0.77 e valor de p : 0.027) como arenoso (ANOSIM R: 1.0 e valor de p : 0.030) (Figura 8a e b). Os parâmetros Ds e RP foram os principais fatores alterados devido ao manejo com tráfego (PD). Desta forma, a formação dos grupos distintos da comunidade de AOA pode estar correlacionada com a alteração destes fatores afetados pelo manejo.

Ao observar a PCoA das estruturas da comunidade de AOB, nota-se que para solos argilosos ocorre a separação entre tratamentos mas com uma leve sobreposição entre eles (ANOSIM R: 0.60 e valor de p : 0.029). Além disso, o tratamento PD teve correlação com Ds e RP (Figura 8c). Entretanto, em solos arenosos não houve uma diferenciação dos grupos, ou seja, não teve alteração na estrutura da comunidade de AOB submetida a diferentes tratamentos (ANOSIM R: 0.11 e valor de p : 0.201) (Figura 8d).

Figura 8: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) relacionadas com RP (Resistência a penetração) e DS (Densidade do solo) nos dois tratamentos PD e PDTR na camada de 0-10 cm. a) e c) estrutura da comunidade dos microrganismos oxidadores de amônia no solo argiloso. b) e d) estrutura da comunidade microrganismos oxidadores de amônia no solo arenoso.

A nitrificação é uma etapa chave para o ciclo do nitrogênio, pois é um processo limitante para a ocorrência de todo o ciclo, além de ser um processo filogeneticamente restrito, portanto apresentando baixa redundância funcional. Com isso, esse processo apresenta características que o tornem um possível indicador da qualidade do solo (PEREIRA E SILVA et al., 2012). Além disso, a nitrificação relaciona-se diretamente com a disponibilidade de N para as plantas (TAGO et al., 2015). Sendo assim, é essencial avaliar os efeitos do tráfego agrícola durante a colheita sobre sua diversidade.

A estrutura da comunidade AOA foi responsiva aos tratamentos que envolvem o tráfego ou não durante a colheita (PD e PDTR), independente do tipo de solo. Um

estudo realizado com microcosmos mostrou que no início do experimento, logo após a perturbação, houve um predomínio de AOA, demonstrando uma possível relevância desse grupo no processo de nitrificação em ambientes perturbados (PEREIRA E SILVA, 2013). Outro aspecto interessante, é que AOA reage mais rápido as condições de alternância de ambientes aeróbicos/anaeróbicos (CHEN et al., 2008). E no presente estudo, nota-se também que a estrutura da comunidade de AOA se diferenciou mais nos tratamentos PD e PDTR do que a de AOB.

No presente trabalho, os resultados referentes a comunidade de AOB em solo argiloso revelam ser mais responsiva em relação aos tratamentos, apesar de ocorrer uma leve sobreposição, do que no solo arenoso, o qual mostrou semelhança a estrutura da comunidade em ambos os tratamentos. Já foi descrito na literatura uma resposta diferenciada entre os diferentes manejos de cana-de-açúcar na estruturação da comunidade de AOB (RACHID et al., 2012). Além disso, um estudo envolvendo comunidades de AOA e AOB em solos cultivados com batata verificou que a textura do solo influenciou a comunidade de AOB, enquanto para AOA o efeito da textura não foi significativo (DIAS et al., 2012). Outro trabalho também mostra que AOB tem uma variação maior em diferentes texturas de solo do que comparada a AOA, indicando que a comunidade de AOB é mais dinâmica (PEREIRA E SILVA et al., 2012). Com isso, observamos que apesar da comunidade de AOB não alterar significativamente a sua estrutura de comunidade, esses organismos costumam ser mais responsivos em solos de textura argilosa, fato esse comprovado em nosso trabalho.

Em relação a abundância AOA, nota-se que a quantificação do gene *amoA* foi superior nos tratamentos PDTR (sem tráfego). No solo argiloso é notável que a abundância de AOA no PD é inferior (aproximadamente 8,0 para PD e 8,2 para PDTR), entretanto não apresentou diferença significativa (Figura 9). Porém, no solo arenoso a diferença entre os tratamentos é mais nítida (cerca de 7,6 para PD e 8,0 para PDTR), sendo estatisticamente significativa. Além disso, a quantificação de AOA foi maior do que a de AOB.

Em relação abundância de bactérias oxidadoras de amônia (AOB), apesar da estatística não ter mostrado diferença entre os tratamentos realizados por comparação de médias, nota-se que em ambos os tipos de solo o tratamento PDTR apresentou menor abundância destes, ou seja, o inverso do comportamento observado de AOA (Figura 9).

Figura 9: Quantificação do gene *amoA* para microrganismos oxidadores de amônia na camada 0 a 10 cm. Os valores expressos em logaritmo do número de cópias por grama de solo representam as médias de três repetições e as barras o desvio padrão. Letras minúsculas representam a comparação entre tratamentos para cada tipo de solo. A comparação de médias foi feita com teste ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

Na avaliação de abundância dos microrganismos nitrificantes, os valores encontrados na quantificação foram similares a outros trabalhos realizados em solos agrícolas. Foi observado uma prevalência na abundância de AOA em relação a AOB (LAMMEL et al., 2015; PEREIRA E SILVA et al., 2012; TAGO et al., 2015). Alguns dos possíveis motivos de ocorrência de maior quantidade de AOA já foram levantados na discussão do predomínio de arqueias em situações onde houve fertilização nitrogenada e aplicação de pesticidas (LAMMEL et al., 2015). Em solos agrícolas, com longos períodos de fertilização nitrogenada, possivelmente o processo de nitrificação é principalmente conduzido por AOA (PEREIRA E SILVA et al., 2012). Além disso, outro fator determinante na abundância de AOA é o valor do pH, sendo mais uma razão para o predomínio destes em solos ácidos (PEREIRA E SILVA et al., 2012). E ambos os solos utilizados nesse estudo apresentam pH inferiores a 5,5. Outro fator favorável ao domínio de AOA são os baixos teores de amônia no solo (NICOL et al., 2008).

Outro ponto em destaque é a quantificação de AOA ser superior no tratamento sem tráfego de maquinário, principalmente no solo arenoso. Os grãos de areia

possuem baixa área de superfície específica, conseqüentemente, apresentando baixa capacidade de adsorção de água e outras substâncias inclusive gases. Além disso, os macroporos são formados entre essas unidades estruturais, o que permite a livre movimentação de ar e condução de água no período de infiltração (BRADY; WEIL, 2013). Em contrapartida, a argila apresenta alta área de superfície específica que permite alta capacidade de adsorção, além de apresentar poros entre partículas muito pequenos e irregulares gerando uma lenta movimentação de água e ar no solo (BRADY; WEIL, 2013). Sendo assim, essas características intrínsecas dos solos de texturas arenosas tornam o habitat com condições mais variáveis ao longo do tempo do que os solos de textura argilosa.

Somando-se a essa ideia, o fato de que solos tropicais frequentemente sofrem condições de flutuações de disponibilidade de O_2 em curtos períodos de tempo. E esse cenário pode ser um habitat seletivo para AOA que parecem ser mais adaptadas a essas variações (PAJARES; BOHANNAN, 2016). Outros trabalhos realizados em solos tropicais demonstram que AOA é mais tolerante a longos períodos de baixo O_2 (PETT-RIDGE et al., 2013) e reage mais rapidamente as alterações aeróbica/anaeróbica (CHEN et al., 2008). Em solos cultivados com cana-de-açúcar, a abundância de AOA teve correlação com o teor de água no solo (TAGO et al., 20015).

Em relação a AOB, que apresentou uma tendência de abundância inversa em relação a AOA, Walker e colaboradores (2010) propuseram que a oxidação do amônio possui vias diferentes entre AOA e AOB. Além disso, ocupam nichos ecológicos diferentes, sobrepondo o grupo que tiver condições ambientais do solo favoráveis ao seu desenvolvimento (TAGO et al., 2015). Estudos realizados em áreas cultivadas com cana-de-açúcar demonstraram que a abundância de AOB foi associada a concentração de íons nitrato e que ambos os grupos (AOA e AOB) são importantes na taxa potencial de nitrificação dessa cultura (TAGO et al., 2015).

6.3.2. Análise da composição de microrganismos fixadores de N

O perfil da comunidade e a quantificação dos microrganismos fixadores de N foram realizados através do gene marcador *nifH*. No solo argiloso, pela análise da PCoA nota-se que ocorre uma forte separação dos tratamentos, ou seja, a alteração

dos parâmetros físicos (Ds e RP) provavelmente causou a alteração da comunidade dos fixadores de N (ANOSIM: 0.92, valor de p: 0.028) (Figura 10a).

Em relação a abundância desse gene em solos argilosos, não há diferença significativa na abundância entre os tratamentos (PD: 5,1 e PDTR 5,3) (valor $p < 0.05$) (Figura 11). Curiosamente os resultados no solo arenoso mostrou o inverso, ou seja, não há diferença estrutural na comunidade dos fixadores de N, mas ocorre uma diferenciação na abundância entre PD e PDTR. Observa-se na PCoA que apesar da tendência de separação dos grupos entre tratamentos, não ocorre diferença entre PD e PDTR e nem correlação com os parâmetros físicos do solo (ANOSIM: 0.20 e valor de p: 0.221) (Figura 10b). Entretanto, a quantificação do gene *nifH* foi maior no tratamento com tráfego (PD: 5,6) do que no tratamento sem tráfego de maquinário agrícola durante a colheita (PDTR: 4,7) pela comparação de médias nos testes ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

Os valores da abundância do gene *nifH* variaram entre 10^5 a 10^7 cópias do gene por grama de solo entre diversos solos agrícolas (PEREIRA E SILVA et al., 2011), sendo assim os valores encontrados nesse estudo estão dentro da quantificação esperada.

Um interessante ponto para a discussão é representado pela diferença de tendência apresentada pela comunidade diazotrófica entre solo argiloso e arenoso. Chotte e colaboradores (2002) demonstraram que 70% das bactérias de vida livre que realizam a fixação de nitrogênio estão localizadas na fração argila do solo. Desse modo, podemos sugerir que para os solos argilosos não foi encontrada diferença na abundância entre os tratamentos pelo fato da maioria dos diazotróficos estarem na fração argila, a qual não sofre influência do tráfego na colheita. Por outro lado, a estrutura da comunidade dos fixadores de N se modificou entre os tratamentos, sugerindo que a menor parte dos diazotróficos do solo localizado em outros micro-habitats possivelmente foram responsáveis por alterar o perfil da comunidade.

Ao observar a PCoA referente ao solo arenoso (Figura 10b) o comportamento da estrutura da comunidade não apresentou diferença entre os tratamentos, ou seja, o perfil da comunidade continua similar apesar da alteração da abundância (Figura 11). Em trabalho realizado em solos arenosos foi considerado que as frações de macroagregados maiores que 50 μm são *hot spots* (termo utilizado para referir a locais de alta biodiversidade que necessitam de uma forte atenção para

conservação), sugerindo que esse micro-habitat são favoráveis para as atividades dos diazotróficos, mas não relacionados a maior densidade destes (CHOTTE et al., 2002).

Com isso, ao observar os valores de macroporosidade nota-se que não há diferença entre PD e PDTR (Tabela 3), correspondendo com a não alteração da estrutura da comunidade de fixadores de N. Entretanto, essa sutil interrupção de apenas dois anos no manejo de colheita foi o suficiente para reduzir a abundância dos microrganismos fixadores de N de vida livre, mostrando que para solos arenosos a sensibilidade é maior em termos de abundância do que diversidade. Não é possível dizer claramente o motivo dessa alteração, sugerindo que possivelmente os diazotróficos foram selecionados por impactos durante muitos anos consecutivos na colheita. No solo arenoso, as camadas 10 a 20 e 20 a 40 cm também apresentaram o mesmo comportamento que da camada superficial (Anexo H). As demais camadas do solo argiloso também não apresentaram diferença entre os tratamentos.

Pereira e Silva (2011) sugere que a análise de NOR (o qual inclui o processo de fixação de N) deve ser definida por tipo de textura do solo, devido a diferentes flutuações encontradas em condições ambientais distintas. Além disso, sugeriu que a flutuação na abundância e na composição dos organismos fixadores de N são maiores em solos arenosos do que nos solos argilosos (PEREIRA E SILVA et al., 2011). A abundância do gene *nifH* em solo arenoso foi maior do que a quantificada em solo argiloso-siltoso, sendo um dos principais pontos a maior dinâmica no processo de transformações de nitrogênio nesses solos (STONE et al., 2015). Desse modo, pode-se confirmar que para solos de textura argilosa a diversidade é mais sensível a mudanças enquanto para solos de textura arenosa a abundância destes é mais afetada pelo impacto do tráfego agrícola.

Figura 10: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) relacionadas com RP (Resistência a penetração) e DS (Densidade do solo) nos dois tratamentos PD e PDTR na camada de 0 a 10 cm. Estrutura da comunidade de microrganismos fixadores de nitrogênio. a) em solo argiloso. b) em solo arenoso.

Figura 11: Quantificação do gene *nifH* para microrganismos fixadores de nitrogênio na camada 0 a 10 cm. Os valores expressos em logaritmo do número de cópias por grama de solo representam as médias de três repetições e as barras o desvio padrão. Letras minúsculas representam a comparação entre tratamentos para cada tipo de solo. A comparação de médias foi feita com teste ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

6.3.3. Análise de abundância dos microrganismos desnitrificantes

Os estudos de compactação do solo correlacionado com a microbiologia têm um enfoque mais prático e ambiental ao analisar diferentes impactos no grupo de desnitrificantes, pois a alteração de sua funcionalidade pode acarretar maiores

produções de gases de óxidos de nitrogênio, potencializando o efeito estufa. Avaliando o comportamento dos microrganismos que desempenham esse processo podemos sugerir um possível impacto da alteração dos parâmetros físicos do solo causado pelos diferentes manejos da colheita sob essa comunidade.

Foram quantificados quatro genes funcionais, sendo dois responsáveis por converter nitrito em monóxido de nitrogênio (*nirK* e *nirS*) e dois que produzem enzimas que atuam na conversão de dióxido de nitrogênio em gás nitrogênio (*nosZ* clado I e *nosZ* clado II). A abundância desses quatro genes não foi distinta entre os tratamentos com e sem tráfego de maquinário durante a colheita, independente do tipo de solo (Figura 12). O gene *nosZ* clado I foi o que obteve maior quantificação em ambos os solos (6,3 a 6,5 no argiloso e 6,9 a 7,0 no arenoso). A abundância do gene *nirK* não teve grandes variações comparando os dois tipos de solo com média de 5,5 e 5,3 para os solos argiloso e arenoso, respectivamente. Entretanto, a quantificação dos demais genes foram maiores no solo arenoso. Por exemplo, os valores do gene *nirS* foram 4,6 para o solo argiloso e 5,3 para o solo arenoso, e para o gene *nosZ* clado II 4,8 para o solo argiloso, e 5,3 para o solo arenoso.

Um resultado interessante que foi obtido pela diferença significativa entre os tratamentos PD e PDTR nas camadas subsuperficiais no solo argiloso (Anexo I). Sendo que na camada de 10 a 20 cm a quantificação dos genes *nosZ* clado I e II foram maiores no tratamento sem tráfego durante a colheita (PDTR). Entretanto, na camada de 20 a 40 cm ocorre uma inversão, ou seja, esses genes são mais abundantes no tratamento com tráfego (PD).

Em comparação com os valores de abundância encontrado nesse estudo correspondem aos valores em um solo agrícola cultivado com soja em Latossolo Vermelho de textura argilosa, sendo expresso em logaritmo do número de cópias do gene por grama de solo, como *nirK* 5,7, *nirS* 5,6 e *nosZ* clado I 6,3 (LAMMEL et al., 2015).

Alguns trabalhos demonstram que a abundância de microrganismos desnitrificantes pode ser relacionado diretamente com a emissão de N_2O do solo (LAMMEL et al., 2015; SCHULZ et al., 2017; BAO et al., 2012). Entretanto, diversos trabalhos não acharam correlação entre maior abundância de desnitrificantes com maior pico de emissão do dióxido de nitrogênio (WANG et al., 2017; FRACETTO et al., 2017; LIU et al., 2013). Desse modo, como não foi observada diferença significativa entre os tratamentos é difícil prever se ocorre ou não mudança na

emissão desse gás de efeito estufa. Entretanto, segundo Wang et al. (2017) é possível realizar uma predição do aumento/redução da emissão de N_2O pela relação de abundância dos genes marcadores dos desnitrificantes da seguinte forma: $(nosZ \text{ clado I} + nosZ \text{ clado II})/(nirK+nirS)$. Sendo assim, no presente estudo a abundância dos genes *nosZ* foram superiores aos genes *nirK* e *nirS*, ou seja, possivelmente a emissão de N_2O nesses solos são bem reduzidas.

Um trabalho demonstra essa mesma ideia em relação a mudança do uso da terra em solos da Amazônia, em que foi realizada uma comparação dos solos da floresta nativa com o solo agrícola com pastagem ou soja. Nos solos da floresta a emissão de N_2O é mais de 3x maior do que em solos agrícolas, e corresponde a maior quantificação dos genes desnitrificantes na floresta (LAMMEL et al., 2015). Outro ponto interessante desse trabalho citado é que não houve diferença significativa em abundância de organismos desnitrificantes em áreas de sojas com diferentes anos de cultivo (2 e 25 anos), correspondendo novamente com os resultados encontrados nesse estudo. Além disso, os microrganismos desnitrificantes são grupos diversos filogeneticamente, que possivelmente adquiriram-se na evolução diferentes mecanismos e habilidades para a desnitrificação, contribuindo para a alta redundância funcional desse processo (JONES et al., 2013).

Em relação a quantificação dos genes *nosZ* com diferença do tratamento PD e PDTR em camadas subsuperficiais de solo argiloso possivelmente se relaciona com

a maior sensibilidade ao O_2 da enzima óxido nítrico redutase em comparação com outras enzimas desnitrificantes (MORLEY et al., 2008). Trabalhos realizados com cana-de-açúcar mostraram que a profundidade de 20 a 40 cm é a principal camada afetada pela compactação do solo (CARVALHO et al., 2011; MARASCA et al., 2015). As avaliações foram realizadas em apenas dois anos de mudança no manejo da colheita, sendo que as modificações estruturais do solo são notadas a longo prazo, e análises de curto período são insuficientes para verificar alterações nos parâmetros físicos do solo (MOARAES et al., 2016). Em nossos resultados obtivemos que na camada potencialmente mais compactada (20 a 40 cm) a abundância dos genes *nosZ* clado I e clado II foram maiores no tratamento com tráfego durante a colheita (PD). Desse modo, podemos sugerir que esses microrganismos desnitrificantes podem ser indicadores da mudança das condições no solo a respeito da compactação antes da indicação dos parâmetros físicos.

Figura 12: Quantificação dos genes marcadores de microrganismos desnitrificantes do solo na camada de 0 a 10 cm. Os valores expressos em logaritmo do número de cópias por grama de solo representam as médias de três repetições e as barras o desvio padrão. Letras minúsculas representam a comparação entre tratamento para cada gene. A comparação de médias foi feita com teste ANOVA e Tukey HSD (valor $p < 0.05$).

7. CONCLUSÃO

Nesse Nesse trabalho foi possível observar que apenas dois anos de interrupção do tráfego de maquinários agrícolas foi o suficiente para interferir em parâmetros físicos do solo (RP) na camada superficial de 0 a 10 cm. Desse modo, a mudança no manejo de colheita da cana-de-açúcar foi o fator que influenciou diretamente a estruturação e organização das comunidades microbianas do solo. Entretanto, esse fator não foi capaz de promover modificações significativas na abundância dos grupos microbianos.

- Os grupos de bactérias e arqueias sofreram diferenciação no perfil da comunidade referente ao manejo de colheita, o que demonstra a responsividade desses grupos ao impacto do maquinário;
- Os fungos não tiveram nenhuma diferenciação em relação aos tratamentos possivelmente por ocuparem preferencialmente os macroporos do solo, parâmetro que não variou entre os tratamentos;
- Na etapa de nitrificação, AOA foi mais responsiva do que AOB. Observamos uma forte diferenciação no perfil da comunidade em ambos os solos. Afirmando nossa hipótese, a abundância de AOA sofreu uma redução do tratamento que com tráfego na colheita.
- Os fixadores de nitrogênio tiveram respostas diferentes dependendo da textura do solo. No argiloso ocorreu uma alteração da diversidade. Enquanto que no arenoso a alteração de abundância, afirmando nossa hipótese de aumento na quantificação no tratamento com tráfego.
- A etapa de desnitrificação em subsuperfície ocorreu uma diferenciação na quantificação do gene *nosZ*, sugerindo-o como possível indicador biológico de compactação que antecede os parâmetros físicos.

REFERÊNCIAS

- ABU-HAMDEH N.H. (2003). Soil compaction and root distribution for okra as affected by tillage and vehicle parameters. **Soil & Tillage Research**, 74: 25-35.
- AUBERTIN G.M. e KARDOS L.T. (1965). Root growth through porous media under controlled conditions. **Soil Science of America Proceedings**, 29: 290-293.
- AZEVEDO L., CARVALHO B., MORAIS M., LAMBAIS, M.R. (2015). Early Changes in Soil Metabolic Diversity and Bacterial Community Structure in Sugarcane under Two Harvest Management Systems. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, 39(3): 701-13.
- BACH H. J., TOMANOVA J., SCHLOTER M., and MUNCH J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. **Journal of Microbiological Methods**, 49: 235–245.
- BALASTREIRE, L. A. Potencial de utilização dos conceitos de agricultura de precisão na cultura da cana-de-açúcar. (1999). **STAB**, 16, 22.
- BAO Q., JU X., GAO B., QU Z. (2012). Response of Nitrous Oxide and Corresponding Bacteria to Managements in an Agricultural Soil. **Soil Biology & Biochemistry**, 76: 130-141.
- BAQUERO J.E., RALISCH R., MEDINA C. DE C., TAVARES-FILHO J., GUIMARÃES M. DE F. (2012). Soil physical properties and sugarcane root growth in a red oxisol. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, 36(1): 63-70.
- BELARDO G. C., CASSIA M. T., DA SILVA R. P. (2015). **Processos Agrícolas e Mecanização da Cana-de-Açúcar**, ed. 1, 457- 462.
- BIGATON, A. D. **Diversidade de bactérias e arqueias em solos cultivados com cana-de- açúcar: um enfoque biogeográfico**. 2014. 96 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRADY N.C. and WEIL R.R. Tradução técnica: LEPSCH, I.F. (2013). **Elementos da Natureza e Propriedades do Solo**, ed 3, 438 -545.
- BRAKER G., FESEFELDT A., WITZEL K. (1998). 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**, 64: 3769–3775.
- CAMARGO O.A. e ALLEONI L.R.F. (1997). **Compactação do solo e o desenvolvimento das plantas**. Piracicaba: Esalq, 132.
- CANFIELD D.E., GLAZER A.N., FALKOWSKI P.G. (2010). REVIEW: The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science**, 330: 192-196.

CARVALHO L.A., SILVA JUNIOR C.A., NUNES W.A.G.A., MEURER I., SOUZA JÚNIOR W.S. (2011) Produtividade e viabilidade econômica da cana-de-açúcar em diferentes sistemas de preparo do solo no Centro Oeste do Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, 34:199-211.

CHEN X. P., ZHU Y. G., XIA Y., SHEN J. P., HE J. Z. (2008). Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? **Environmental Microbiology**, 10(8):1978-1987.

CHOTTE J., SHWARTZMANN A., BALLY R., JOCTEUR MONROZIER L. (2002) Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. **Soil Biology Biochemistry**, 34:1083-1092.

DAIMS H., LEBEDEVA E.V., PJEVAC P., HAN P., HERBOLD C., ALBERTSEN M., et al. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, 528(7583): 504-509.

DAVIDSON E.A., KELLER M., ERICKSON H.E., VERCHOT L.V., VELDKAMP E. (2000). Testing a conceptual model of soil emissions of nitrous and nitric oxides. **Bioscience**, 50: 667-680.

DE NEVE S. and HOFMAN G. (2000). Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. **Biology and fertility of soils**, 30(5-6): 544-549.

DE SANTI FERRARA, F. I., OLIVEIRA, Z. M., GONZALES, H. H. S., FLOH, E. I. S., BARBOSA, H. R. (2012). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, 353: 409-417.

DEMANÈCHE S., PHILIPPOT L., DAVID M.M., NAVARRO E., VOGEL T.M., SIMONET P. (2009). Characterization of Denitrification Gene Clusters of Soil Bacteria via a Metagenomic Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(2): 534-537.

DIAS A.C.F., HOOGWOUT E.F., PEREIRA E SILVA M. DE C., SALLES J. F., OVERBEEK L. S. VAN, VAN ELSAS J.D. (2012). Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, 50(July): 85-95.

DINI-ANDREOTE F., ANDREOTE F.D., COSTA R., TAKETANI R.G., VAN ELSAS J.D., ARAÚJO W.L. (2010). Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, 336(1): 337-349.

DOBEREINER, J. (1961). Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinchia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, 15: 211-217.

DURRER A., GUMIERE T., TAKETANI R.G., COSTA D.P. DA, PEREIRA E SILVA M. DE C., ANDREOTE F.D. (2017). The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. **Applied Soil Ecology**, 110: 12-20.

EBRAHIMI A. and OR D. (2016). Microbial community dynamics in soil aggregates shape biogeochemical gas fluxes from soil profiles – upscaling an aggregate biophysical model. **Global Change Biology**, 22: 3141-3156.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de classificação de solo**. Embrapa Solos, 2 ed, 2006.

ERGUDER T.H., BOON N., WITTEBOLLE L., MARZORATI M., VERSTRAETE W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia- oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, 33: 855-869.

FANG H., LIAN J., WANG H., CAI L., YU Y. (2015). Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. **Journal of Hazardous Materials**, 286: 457-465.

FAO. Food and agricultural commodities production: country rank in the world, by commodity. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

FIERER N., JACKSON J.A., VILGALYS R., JACKSON R.B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 4117-4120.

FRACETTO F.J.C., FRACETTO G.G.M., BERTINI S.C.B., CERRI C.C., FEIGL B.J., SIQUEIRA NETO M. (2017). Effect of agricultural management on N₂O emissions in the Brazilian sugarcane yield. **Soil Biology and Biochemistry**, 109: 205-213.

GARDES M. and BRUNS T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, 2: 113–118.

GUMIERE T., DURRER A., BOHANNAN B.J.M., ANDREOTE F.D. (2016). Biogeographical patterns in fungal communities from soils cultivated with sugarcane. **Journal of Biogeography**, 43(10): 2016-2026.

GUMIERE, T. **Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas**. 2012. 147 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

HAKANSSON I. and VOORHEES W. B. Soil compaction. In: LAL, R.; BLUM, W. H.; VALENTINE, C.; STEWARD, B. A. (1998). **Methods for assessment of soil degradation**, 167-179.

HALLIN S., JONES C.M., SCHLOTTER M., PHILIPPOT L. (2009). Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. **ISME Journal**, 3: 597-605.

HARTMANN M., NIKLAUS P.A., ZIMMERMANN S., SCHMUTZ S., KREMER J., ABARENKOV K., LÜSCHER P. (2014). Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. **ISME Journal**, 8(1): 226-44.

HAYATSU M., TAGO K., SAITO M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science & Plant Nutrition**, 54: 33-45.

HEIJDEN M.G.A., BARDGETT R.D., STRAALLENY N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, 11: 296-310.

HENRY S., BAUDOIN E., LÓPEZ-GUTIÉRREZ J. C., MARTIN-LAURENT F., BRAUMAN A., PHILIPPOT L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 59: 327–335.

HENRY S., BRU D., STRES B., HALLET S., PHILIPPOT L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology** 72, 5181-5189.

HERRIDGE D.F., PEOPLES M.B., BODDEY R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, 311, 1-18.

HOLTZ R.D., KOVACS W.D., SHEAHAN T.C. (2010). **An Introduction to Geotechnical Engineering**. Ed 2, 174.

IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

JONES C. M., GRAF D. R., BRU D., PHILIPPOT L., HALLIN S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. **The ISME Journal**, 7: 417–426.

KANDELER E., DEIGLMAYR K., TSCHERKO D., BRU D., PHILIPPOT L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 5957-5962.

KANOKRATANA P., EURWILAICHITR L., POOTANAKIT K., CHAMPREDA V. (2015). Identification of glycosyl hydrolases from a metagenomic library of microflora in sugarcane bagasse collection site and their cooperative action on cellulose degradation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 119: 384-391.

KOWALCHUK G. A., STEPHEN J. R., DE BOER W., PROSSER J., EMBLEY T.M., WOLDENDORP J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 1489-1497.

LAMMEL D.R., FEIGL B.J., CERRI C.C., NÜSSLEIN K. (2015). Specific Microbial Gene Abundances and Soil Parameters Contribute to C, N, and Greenhouse Gas Process Rates after Land Use Change in Southern Amazonian Soils. **Frontiers in Microbiology**, 6(oct): 1-14.

LETEY J. (1985). Relationship between soil physical properties and crop production. **Advances in Soil Science**, 1: 277-294.

LIU W. T., MARSH T. L., CHENG H., FORNEY L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 4516–4522.

LIU X., CHEN C.R., WANG W.J., HUGHES J.M., LEWIS T., HOU E.Q., et al. (2013). Soil environmental factors rather than denitrification gene abundance control N₂O fluxes in a wet sclerophyll forest with different burning frequency. **Soil Biology and Biochemistry**, 57: 292-300.

LOBO, D. **Etanol: estudo da UNESP aponta vantagens para solo coberto com palha de cana.** Julho 2011. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/32386725920327850689/estudo-da-unesp-aponta-vantagens-para-solo-coberto-com-palha-de-cana/>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

LOZANO N., ROLIM M.M., OLIVEIRA V.S., TAVARES U.E., PEDROSA E.M.R. (2013). Evaluation of soil compaction by modeling field vehicle traffic with SoilFlex during sugarcane harvest. **Soil and Tillage Research**, 129: 61-68.

MARASCA I., LEMOS S.V., SILVA R.B., GUERRA S.P.S., LANÇAS K.P. (2015) Soil compaction curve of an oxisol under sugarcane planted after in-row deep tillage. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 39: 1490-1497.

MENDES R., KRUIJT M., DE BRUIJN I., DEKKERS E., VAN DER VOORT M., SCHNEIDER J.H., PICENO Y.M., DESANTIS T.Z., ANDERSEN G.L., BAKKER P.A., RAAIJMAKERS J.M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, 332: 1097-1100.

MENON M., JIA X., LAIR G.J., FARAJ P.H., BLAUD A. (2015). Analysing the impact of compaction of soil aggregates using X-ray microtomography and water flow simulations. **Soil & Tillage Research**, 150: 147-157.

MICHOTÉY V., MÉJEAN V., BONIN P. (2000). Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd*₁-denitrifying bacteria in environmental marine samples. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1564–1571.

MORAES M.T. de, DEBIASI H., CARLESSO R., FRANCHIN, J.C., SILVA V.R. da, LUZ F.B. da. (2016). Soil physical quality on tillage and cropping systems after two decades in the subtropical region of Brazil. **Soil and Tillage Research**, 155: 351-362.

MOREIRA F.M.S. e SIQUEIRA J.O. (2010). **Microbiologia e bioquímica do solo**, ed 2. Lavras: UFLA, 729 p.

MORLEY N., BAGGS E.M., DÖRSCH P., BAKKEN L. (2008). Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂⁻ and O₂ concentrations. **FEMS Microbiology Ecology**, 65: 102-112.

MOYER C. L., TIEDJE J. M., DOBBS F. C., KARL D. M. (1998) Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, 45: 303-317.

MUYZER G., DE WAAL E.C., UITTERLINDEN A. (1993). Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 59: 695-700.

NICOL G. W., LEININGER S., SCHLEPER C., PROSSER J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 10: 2966–2978.

OTTO R., SILVA A.P., FRANCO H.C.J., OLIVEIRA E.C.A., TRIVELIN P.C.O. (2011). High soil penetration resistance reduces sugarcane root system development. **Soil and Tillage Research**, 117: 201-210.

PAJARES S. and BOHANNAN B.J.M. (2016). Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. **Frontiers in Microbiology**, 7(jul): 1-20.

PASTORELLI R., VIGNOZZI N., SILVIA L., PICCOLO R., ORSINI R., SEDDAIU G., ROGGERO P.P., PAGLIAI M. (2013). Consequences on macroporosity and bacterial diversity of adopting a no-tillage farming system in a clayish soil of Central Italy. **Soil Biology and Biochemistry**, 66: 78-93.

PEREIRA E SILVA M. C., SCHLOTER-HAI B., SCHLOTER M., VAN ELSAS J. D., SALLES, J. F. (2013). Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. **PLoS ONE**, 8(9):e74500.

PEREIRA E SILVA M.C., POLY F., GUILLAUMAUD N., VAN ELSAS J.D., SALLES J.F. Fluctuations in ammonia oxidizing communities across agricultural soils are driven by soil structure and Ph. (2012). **Frontiers in Microbiology**, 3: 77.

PEREIRA E SILVA M.C., SEMENOV A.V., VAN ELSAS J.D., SALLES J.F. (2011). Seasonal variations in diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, 77: 57-68.

PETT-RIDGE J., PETERSEN D.G., NUCCIO E., FIRESTONE M.K. (2013). Influence of oxic/anoxic fluctuations on ammonia oxidizers and nitrification potential in a wet tropical soil. **FEMS Microbiology Ecology**, 85: 179-194.

PHILIPPOT L., HALLIN S., SCHLOTER M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. **Advances in Agronomy**, 96: 249-305.

PIÑA-OCHOA E., HØGSLUND S., GESLIN E., CEDHAGEN T., REVSBECH N.P., NIELSEN L.P., SCHWEIZER M., JORISSEN F., RYSGAARD S., RISGAARD-PETERSEN N. (2010). Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among *Foraminifera* and *Gromiida*. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 107(3): 1148-1153.

POLY F., MONROZIER L. J., BALLY R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, 152: 95–103.

PREVEDELLO C.L., ARMINDO R. (2015). **A Física do Solo com Problemas Resolvidos**. 2ª Edição Revisada e Ampliada. 2. Ed., 474.

PUPIN, B. **Propriedades Microbiológicas Do Solo Alteradas Por Compactação**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

RACHID C.T.C.C., PICCOLO M.C., LEITE D.C.A., BALIEIRO F.C., COUTINHO H.L.C., VAN ELSAS J.D., PEIXOTO R.S., ROSADO A.S. (2012). Physical-Chemical and Microbiological Changes in Cerrado Soil under Differing Sugarcane Harvest Management Systems. **BMC Microbiology** 12(1):170.

RACHID C.T.C.C., SANTOS A.L., PICCOLO M.C., BALIEIRO F.C., COUTINHO H.L.C., PEIXOTO, R.S., TIEDJE J.M., ROSADO A.S. (2013). Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. **PLoS ONE**, 8(3): 1-8.

RADL V., CHRONAKOVA A., CUHEL J., SIMEK M., ELHOTTOVA D., WELZL G., SCHLOTER M. (2014). Bacteria dominate ammonia oxidation in soils used for outdoor cattle overwintering. **Applied Soil Ecology**, 77: 68-71.

RAIJ B. VAN, ANDRADE J. C., CANTARELLA H., QUAGGIO J. A. (2001). Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: **Instituto Agrônomo de Campinas**, p. 202.

REINERT D.J., REICHERT J.M., SILVA V.R. (2001). **Propriedades físicas dos solos em sistemas de plantio direto irrigado**. In: CARLESSO, R.; PETRY, M.T.; ROSA, G.M. & CERETTA, C.A. Irrigação por aspersão no rio Grande do Sul. Santa Maria, 156.

ROSSETTO R., CANTARELLA H., DIAS F. L. F., LANDELL M. G. A., VITTI A. C. (2008) Manejo conservacionista e reciclagem de nutrientes em cana-de-açúcar tendo em vista a colheita mecânica. **Informações Agronômicas**, 8-13.

ROTTHAUWE J. H., WITZEL K. P., LIESACK W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 4704–4712.

RUSER R., FLESSA H., RUSSOW R., SCHMIDT G., BUEGGER F., MUNCH J.C. (2006). Emission of N₂O, N₂ and CO₂ from soil fertilized with nitrate: effect of compaction, soil moisture and rewetting. **Soil Biology & Biochemistry**, 38: 263-274.

SAHAN E. and MUYZER G. (2008). Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia- oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, 64: 175–186.

SAVARIO C.F. and HOY J.W. (2010). Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. **Plant and Soil**, 341: 63–73.

SCHULZ S., KÖLBL A., EBLI M., BUEGGER F., SCHLOTTER M., FIEDLER S. (2017). Field-Scale Pattern of Denitrifying Microorganisms and N₂O Emission Rates Indicate a High Potential for Complete Denitrification in an Agriculturally Used Organic Soil. **Microbial Ecology**, 1-6.

SCHÜTTE U. M. E., ABDO Z., BENT S. J., WILLIAMS C. J., SCHNEIDER G. M., SOLHEIM B., FORNEY L. J. (2009). Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, 3, 11, 1258–1268.

SENE M., VEPRASKAS M.J., NADERMAN G.C., DENTON H.P. (1985). Relationships of soil texture and structure to corn yield response to subsoiling. **Soil Science Society of America Journal**, 49: 422-427.

SILVER W. L., HERMAN D. J., FIRESTONE M. K. (2001). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. **Ecology**, 82: 2410-2416.

SIMONET P., GROSJEAN M. C., MISRA A. K., NAZARET S., COURNOYER B., et al. (1991). *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 3278–3286.

SMITH C.J., NEDWELL D.B., DONG L.F., OSBORN A.M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 36120-3622.

SOANE B.D. (1990). The role of organic matter in soil compactibility: a review of some practical aspects. **Soil & Tillage Research**, 16: 179-201.

SOUZA R. S. C. DE, OKURA V. K., ARMANHI J. S. L., JORRÍN B., LOZANO N., SILVA M. J. DA, ARRUDA, P. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Nature Scientific Reports**, 6(28774), 1-15.

STEPHEN J. R., CHANG Y-J, MACNAUGHTON S. J., KOWALCHUK G. A., LEUNG K. T., FLEMMING C. A. and WHITE D. C. (1999). Effect of toxic metals on indigenous soil *b*-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 95-101.

ST-MARTIN A. and BOMMARCO R. (2016). Soil compaction and insect pollination modify impacts of crop rotation on nitrogen fixation and yield. **Basic and Applied Ecology**, 17(7): 617-626.

STONE M.M., KAN J., PLANTE A. F. (2015). Parent material and vegetation influence bacterial community structure and nitrogen functional genes along deep tropical soil profiles at the Luquillo Critical Zone Observatory. **Soil Biology and Biochemistry**, 80: 273-282.

STROUS M., PELLETIER E., MANGENOT S., et al. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an *anammox* bacterium from a community genome. **Nature**, 440: 790-794.

STURITE I., DALMANNSDOTTIR S. and MURRAY P.J. (2012). Effects of daylength and soil compaction on white clover growth and N₂-fixation. **Grassland-a European resource? Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation**, 181-183.

TAGO, K., OKUBO, T., SHIMOMURA, Y., KIKUCHI, Y., HORI, T., NAGAYAMA, A., & HAYATSU, M. (2015). Environmental Factors Shaping the Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Sugarcane Field Soil. **Microbes and Environments**, 30(1): 21-28.

TAVARES FILHO, J., BARBOSA, G. M. D. C., & RIBON, A. A. (2010). Physical properties of dystrophic Red Latosol (Oxisol) under different agricultural uses. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, 34(3): 925-933.

THROBACK I. N., ENWALL K., JARVIS A., HALLIN S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, 49: 401–417.

TORSVIK V., DAAE F.L., SANDAA R.A., ØVREÅS L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, 5: 240-245.

TOURNA M., FREITAG T. E., NICOL G. W., PROSSER J. I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, 10: 1357–1364.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR. Histórico de Produção e Moagem por safra – 2015/2016. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=92>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

URQUIAGA S., XAVIER R., MORAIS R.F., BATISTA R., SCHULTZ N., LEITE J.M., SÁ J.M. e, BARBOSA K.P., RESENDE A., ALVES B.J.R., BODDEY R.M. (2012). Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data of the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, 356: 5-21.

VAN ELSAS J.D., CHIURAZZI M., MALLON C.A., ELHOTTOVĀ D., KRIŠTŮFEK V., SALLES J.F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 109(4):1159-1164.

VAN ELSAS J.D., JANSSON P.N., TREVORS J.T. (2006) **Modern Soil Microbiology**. Ed 2, 239.

VASCONCELOS, A.C.M. **Desenvolvimento do sistema radicular da parte aérea de socas de cana-de-açúcar sob dois sistemas de colheita: crua mecanizada e queimada manual**. 2002. 140p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

VOORHEES W.B. (1992). Wheel-induced soil physical limitations to root growth. **Advances in Soil Science**, 1: 73-95.

WALKER C.B., DE LA TORRE J.R., KLOTZ M.G., URAKAWA H., PINEL N., ARP D.J., et al. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107: 8818-8823.

WANG Y., UCHIDA Y., SHIMOMURA Y., AKIYAMA H., HAYATSU M. (2017) Responses of denitrifying bacterial communities to short-term waterlogging of soils. **Scientific Reports**, 7(1): 1-13.

WESSEN E., HALLIN S., PHILIPPOT L. (2010). Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. **Soil Biology & Biochemistry**, 42: 1759-1765.

YEOH Y.K., PAUNGFOO-LONHIENNE C., DENNIS P.G., ROBINSO N., RAGAN M.A., SCHMIDT S., HUGENHOLTZ P. (2015). The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, 18: 1338-1351.

YU Y., ZHANG J., CHEN W., ZHONG W., ZHU T., CAI Z. (2014). Effect of land use on the denitrification, abundance of denitrifiers, and total nitrogen gas production in the subtropical region of China. **Biology and Fertility of Soils**, 50: 105-113.

ZEHR J.P., JENKINS B.D., SHORT S.M., STEWARD G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, 5: 539-554.

ZHANG B., DENG H., WANG H., YIN R., HALLETT P. D., GRIFFITHS B. S., DANIELL T. J. (2010). Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? **Soil Biology and Biochemistry**, 42(5): 850-859.

ZUMFT, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61: 533-616.

ANEXOS

Anexo A: Estrutura da comunidade microbiana na camada 10-20 cm.

Anexo B: Estrutura da comunidade microbiana na camada 20-40 cm.

Anexo C: Abundância da comunidade microbiana nas camadas subsuperficiais.

Anexo D: Abundância de AOA e AOB nas camadas subsuperficiais.

Anexo E: Estrutura da comunidade AOA nas camadas subsuperficiais.

Anexo F: Estrutura da comunidade AOB nas camadas subsuperficiais.

Anexo G: Estrutura da comunidade dos fixadores de nitrogênio nas camadas subsuperficiais.

Anexo H: Abundância da comunidade dos fixadores de nitrogênio nas camadas subsuperficiais.

Anexo I: Abundância da comunidade de desnitrificantes nas camadas subsuperficiais.