**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem
microbiana associados às emissões de gases do efeito estufa sob
diferentes usos da terra**

Clovis Daniel Borges

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

**Piracicaba
2015**

Clovis Daniel Borges
Bacharel em Ciências Biológicas

**Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem microbiana
associados às emissões de gases do efeito estufa sob diferentes usos da terra**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **TSAI SIU MUI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

Piracicaba
2015

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

Borges, Clovis Daniel

Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem microbiana associados às emissões de gases do efeito estufa sob diferentes usos da terra / Clovis Daniel Borges. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2015. 109 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. Mudanças climáticas 2. Ecologia microbiana do solo 3. nosZ 4. pmoA 5. Gases do efeito estufa 6. Mitigação 7. Qualidade do solo I. Título

CDD 631.46
B732m

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

DEDICO

*Aos meus pais Silvestre Borges e
Matildes da Silva Borges pelo apoio, amor,
incentivo em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fundamental na minha existência e por tornar possível mais esta etapa da minha vida...

Aos familiares Silvestre, Matildes, Jardel, Daniela, Felipe e Eduardo pela alegria, amizade, força e apoio em todos os momentos desta caminhada.... Muito obrigado por acreditarem, nada disso seria possível sem vocês e Deus em meu coração.

A Professora Dra. Tsai Siu Mui, por ter aceitado o desafio de orientar-me, pela constante aprendizagem a mim passada e pela experiência de vida transmitida neste curto espaço de tempo.... Meu muito obrigado Professora!!!

A minha noiva e mulher Beatriz Maria Ferrari, que se fez presente em todos os momentos desta jornada, principalmente em me acompanhar nesta caminhada dando apoio, carinho e conforto. Sei que para ela não foi fácil me aturar e conciliar também seus estudos... Amo e adoro demais... Obrigado de coração!!!

E, em especial ao Dr. Fábio Martins Mercante, que se fez presente em todos os momentos desta caminhada através de sua amizade, a quem serei eternamente grato, valeu, obrigado Fábio!!!

A Embrapa-CPAO, que permitiu nossa entrada na área experimental para realização deste trabalho.

Ao grande amigo Wagner Picinini, que nunca êxitou em contribuir na realização deste trabalho, mas principalmente pela verdadeira amizade construída durante este convívio.... Salve Wagner.

Aos colegas de laboratório, agradeço pelo convívio e amizade que, em curto prazo se fizeram presentes em minha vida. Com certeza deixarão saudades!!! Atenção para à chamada! Lammel, Paula, Naissa, Enéas, Gustavo, Lucas (Tintin), Felipe, Fábio, Marina, Lucas M., Marcela, Fabi, Acácio, Andressa, Caio, Aline, Fernandinha, Marília, Maju, Dennis e Dani.....Valeu.

Ao meu sogro Valdemar Ferrari, um grande pescador e a minha sogra Maria Coral, quanta comida gostosa.. Afff... sem contar, que me acolheram com membro desta família.... Só tenho a agradecer... Dú, Chico, Re e Angela... Sucesso para todos...

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado, Encom Pronex Fapesp-Encomenda PRONEX - FAPESP 143307/2011-8, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Mudanças Climáticas Globais (PFPMCG) 08/58114-3, pelo suporte financeiro dado ao desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigado!!!

Aos componentes da banca examinadora, pelo prestígio em tê-los como avaliadores deste trabalho.

A Eliana da biblioteca da Escola Superior Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), pela normalização deste documento.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

EPÍGRAFE

“Life would not long remain possible in the absence of microbes”.

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Hipótese.....	16
1.2 Objetivo geral.....	16
1.3 Objetivos específicos.....	16
1.4 Revisão Bibliográfica.....	17
1.4.1 Emissões de gases na agricultura.....	17
1.4.2 Nitrificação e desnitrificação na agricultura.....	19
1.4.3 Potencial dos procariotos de controlar as emissões de N ₂ O.....	21
1.4.4 Os efeitos da elevada concentração de CO ₂ e temperatura na comunidade microbiana do solo.....	23
1.4.5 Interação entre plantas e micro-organismos.....	26
Referências.....	28
2 ESTRUTURA MICROBIANA DO SOLO E GENES FUNCIONAIS DO CICLO DO NITROGÊNIO NO SISTEMA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA APRESENTOU IMPORTANTE CAPACIDADE EM MITIGAR O N ₂ O.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	39
2.1 Introdução.....	40
2.2 Material e Métodos.....	42
2.2.1 Caracterização da área experimental.....	42
2.2.2 Carbono orgânico, umidade e poros preenchidos por água.....	45
2.2.3 Extração de DNA genômico e quantificação de genes por PCR quantitativo em tempo real.....	45
2.2.4 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do Gene 16S rRNA de Bactéria.....	46
2.2.5 Análise estatística.....	48
2.3 Resultados.....	59
2.3.1 Propriedades físico-química dos solos.....	59
2.3.2 Abundância e estrutura microbiana do solo.....	50
2.3.3 Densidade de genes funcionais.....	58

2.4 Discussão.....	63
2.5 Considerações Finais.....	68
Referências.....	68
3 AUMENTO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ ALTERAM A ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA E AS EMISSÕES DE N ₂ O.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	76
3.1 Introdução.....	76
3.2 Material e Métodos.....	78
3.2.1 Caracterização do sistema Trop-T-FACE.....	78
3.2.2 Amostragem do solo e solo da rizosfera.....	80
3.2.3 Determinação de poros preenchidos por água.....	81
3.2.4 Avaliação das emissões de gases efeito estufa.....	82
3.2.5 Extração de DNA genômico e quantificação do gene <i>nosZ</i> por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	83
3.2.6 Sequenciamento do metagenoma Nextera-Illumina.....	84
3.2.7 Análise metagenômica.....	85
3.2.8 Análise estatística.....	86
3.3 Resultados.....	87
3.3.1 Atributos físicos do solo.....	87
3.3.2 Emissões de gases do efeito estufa.....	88
3.3.3 Potencial de aquecimento global.....	91
3.3.4 Quantificação de genes funcionais e 16S rRNA.....	91
3.3.5 Classificação taxonômica do solo.....	94
3.3.6 Classificação funcional do solo.....	98
3.3.7 Diversidade taxonômica e funcional do solo.....	100
3.3.8 Correlação entre gases de efeito estufa com os atributos ambientais e biológicos.....	101
3.4 Discussão.....	102
3.5 Considerações Finais.....	105
Referências.....	105

RESUMO

Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem microbiana associados às emissões de gases do efeito estufa sob diferentes usos da terra

A agropecuária brasileira apresenta relevante papel sócio-econômico para o país, e constantemente busca novas tecnologias para alcançar uma agricultura sustentável. Com as mudanças que vêm ocorrendo no uso da terra, principalmente nas regiões tropical e subtropical, o Brasil vem sendo apontado como um grande emissor dos gases do efeito estufa. A conversão de florestas em sistemas agrícolas pode levar a um rápido aumento dos fluxos de CO₂, CH₄ e N₂O no ambiente, além de potencializar o efeito estufa e ameaçar os diferentes ecossistemas. Em busca de sistemas mais conservacionistas, que possam mitigar o efeito estufa, os sistemas convencional, plantio direto, integração lavoura-pecuária e pastagem com histórico bem definido, foram selecionados nesse estudo para melhor compreensão e discernimento das possíveis mudanças oriundas dos sistemas avaliados no bioma do Cerrado. Em um segundo momento avaliamos o potencial da elevada concentração de CO₂ aquecimento das parcelas em sistema sob *temperature free-air controlled enhancement* e *carbon dioxide free-air enrichment* (T-FACE) para avaliar as alterações funcionais e composição microbiana do solo. Os objetivos desse estudo foram: determinar a quantidade de células total dos genes 16S rRNA bactéria, archaea e dos genes funcionais *amoA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *nosZ*, presentes em diferentes sistemas de manejo do solo. Bem como, possíveis alterações na comunidade microbiana do solo sob elevada concentração de CO₂ e aquecimento das parcelas. Para acessar o número de cópias dos genes foi utilizado o PCR quantitativo, a estrutura da comunidade microbiana foi determinada pela técnica de T-RFLP e a composição microbiana pelo sequenciamento de terceira geração. Os resultados dos sistemas de plantio direto e integração lavoura-pecuária revelaram importante capacidade de controlarem as emissões de N₂O. Notoriamente, o número de cópias do gene *nosZ* teve sua densidade incrementada nos dois sistemas de plantio direto e integração lavoura-pecuária, este gene apresenta alto potencial para monitorar a desnitrificação completa do N₂O a N₂. Adicionalmente, a elevada concentração de CO₂ e elevada temperatura incrementaram o número de cópias dos genes *nifH*, AOB e *nosZ* ao longo do experimento. A análise da diversidade dos grupos taxinômicos e funcional revelou que a diversidade funcional foi alterada nas parcelas com maior emissão de N₂O, apresentando maior abundância de genes (2-3 vezes) envolvidos na desnitrificação, acarretando possivelmente essas maiores emissões de N₂O pela microbiota do solo.

Palavras-chave: Mudanças climáticas; Ecologia microbiana do solo; *nosZ*; Gases do efeito estufa; Mitigação; Qualidade do solo, Agricultura sustentável

ABSTRACT

Quantitative and temporal estimation of microbial genes related to greenhouse gases under different land uses

Agriculture activities have large an important socio-economic role for a country, and are constantly searching for new technologies to achieve sustainable agriculture. Changes have occurred in land use, especially in tropical and subtropical regions and Brazil has been considered as a large emitter of greenhouse gases from agricultural systems. The conversion of forests to agricultural systems can lead to a fast increase of CO₂ streams, CH₄ and N₂O for atmosphere, which enhances the greenhouse effect and threaten the ecosystem. In search of more conservation systems that can mitigate the greenhouse gas, the conventional, no-tillage, integrated crop-livestock and pasture systems with well defined historical management were selected in this study to better understand and decipher the possibles changes resulting in the biome Cerrado. In a second study, it was evaluated the potential of high concentration of CO₂ and warming plots on system under increased temperature free-air controlled enhancement e carbon dioxide free-air enrichment (T-FACE) to assess the functional changes and microbial composition in the soil. The objectives of this study were to determine the total amount of the 16S rRNA Bacteria, Archaea and the functional genes *amoA*, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *nosZ* present under different soil management and evaluate the possible changes in the soil microbial community under high CO₂ concentration and warming in the plots. To access the number of copies genes we used quantitative PCR, with the microbial community structure determined by T-RFLP and the microbial composition by Illumina next-generation sequencing. No-tillage and integrated crop-livestock revealed important capability to control N₂O emissions. Notably, the high number of *nosZ* gene copies was found under no-tillage and integrated crop-livestock systems. This gene has a high potential to monitor the oxidation of N₂O to N₂. In addition, high CO₂ concentration and elevated temperature increased 2-3 folds the number of copies of the *nifH* genes, and AOB *nosZ* throughout the experiment. The analysis of the diversity of functional taxonomic groups revealed that functional diversity has changed in plots with high N₂O emissions, and showed a greater abundance of genes involved in denitrification, which possibly has stimulated the emissions of N₂O from soil microbiota.

Keywords: Climate changes; Soil microbial ecology; *nosZ*; Greenhouse gases; Mitigation; Soil quality, Sustainable agriculture

1 INTRODUÇÃO

Aumentar a eficiência de práticas convencionais, integrar ou substituir por alternativas mais sustentáveis e promover um novo desenho do agroecossistema, baseado em um novo conjunto de processos ecológicos, são alguns dos desafios apontados para novos rumos da agricultura. A implementação de boas práticas agrícolas, usando menos combustíveis fósseis, que possam reduzir a erosão e condicionar o aumento do estoque de carbono nos compartimentos do solo, podem ser significativamente modificados pela redução do preparo do solo. A formação de agregados do solo em sistema conduzidos em plantio direto podem proteger os nutrientes e condicionar a melhores nichos para colonização de muitos organismos do solo, comparado ao sistema convencional com preparo do solo. Assim a redução das práticas de manejo podem reduzir riscos de erosão do solo das fortes chuvas, melhorando a agregação do solo e as propriedades hidrológicas. Estes efeitos podem ser maximizados com uso de plantio direto combinado com sistemas de rotação de culturas (BRONICK; LAL, 2005; MONTGOMERY, 2007).

Desta forma, a transferência de tecnologias genes resistentes à seca, resistentes a pragas, melhores insumos biológicos, novos fertilizantes e alguns tipos manejos do solo, estão associados com diminuição de impactos negativos ao solo contribuindo com maior potencial produtivo. Sistemas de manejo como plantio direto e integração lavoura-pecuária-floresta, podem resultar em uma maior intensificação do uso do solo agregando maior produtividade resultando em declínio de abertura de novas áreas para produção de grãos (BARRETTO et al., 2013). A combinação de tecnologias como plantio direto, integração lavoura-pecuária-floresta conduzidos em rotação de culturas pode conduzir os fazendeiros a definição de melhores práticas agrícolas com base na renda econômica ao lado da conservação do solo e produtividade de grãos (COOK, 2006). No caso do Brasil, o conhecimento e uso da biodiversidade, a busca por certificação e rastreabilidade são exemplos de respostas que a pesquisa agropecuária busca para uma produção mais sustentável.

Contudo, o uso de indicadores é um importante guia do gerenciamento do solo para futuras decisões. Tradicionalmente, a qualidade do solo tem sido focada primariamente nas propriedades químicas e físicas do mesmo (OLIVER et al., 2013). Em geral a qualidade do solo pode ser influenciada pelo manejo, clima e tipo de solo. Diferentes conjuntos de dados indicadores da qualidade do solo têm sido

proposto, desde diferentes classes texturais a sistemas de manejo do solo para uma variedade de culturas (BORGES et al., 2013). Entre os parâmetros químicos e físicos conhecidos usados como indicadores de qualidade do solo, estão a matéria orgânica e a estrutura do solo, mas sem um consenso de quais indicadores biológicos do solo que poderiam responder a sistemas agrícolas sustentáveis (YIN et al., 2010).

Os processos biogeoquímicos do solo, são em grande parte, realizados pela comunidade microbiana do solo. A estrutura da comunidade microbiana, sua função, distribuição da biomassa e atividade enzimática podem ser afetadas pelos fatores do solo tais como tipo de solo, espécie de planta, manejo e rotação de culturas (MORALES et al., 2010; ATTARD et al., 2011; FIGUEROLA et al., 2012). Assim, torna-se importante considerar os indicadores microbiológicos quando se trata de avaliação da qualidade do solo e inversamente, revelar os efeitos das características dos solos na estrutura microbiana ainda escassa em solos tropicais.

1.1 Hipótese

Os microrganismos do solo são os principais responsáveis pela ciclagem do nitrogênio no ambiente, alterações antrópicas podem resultar em mudanças nas emissões de N_2O para atmosfera. E os genes funcionais do ciclo do N podem ser indicadores do controle destas emissões.

1.2 Objetivo geral

Determinar a comunidade microbiana do solo e os genes funcionais associados à ciclagem de nitrogênio no solo.

1.3 Objetivos Específicos

(i) Determinar a estrutura da comunidade microbiana (T-RFLP) e abundância dos genes (*nifH*, AOA, AOB, *nirS*, *nirK*, *cnorB* e *nosZ*) associados à ciclagem de nitrogênio no solo sob diferentes sistemas de manejo (convencional, plantio direto, integração lavoura-pecuária, pastagem e vegetação nativa).

(ii) Avaliar a abundância dos genes (*pmoA*, *nifH*, AOA, AOB e *nosZ*) e as alterações nos grupos taxonômicos relacionados às emissões de N₂O sob temperatura e concentração de CO₂ atmosférica elevadas.

1.4 Revisão Bibliográfica

1.4.1 Emissões de gases na agricultura

O setor agrícola mundial contribui significativamente para o aumento emissões de gases do efeito estufa (GEE), através da perda do carbono devido os repetidos distúrbios do solo para o cultivo, uso de combustível fóssil na produção dos fertilizantes sintéticos, bem como durante as aplicações de fertilizantes e pesticidas, os quais liberam direta ou indiretamente os GEE para a atmosfera (SMITH, 2008). Estima-se que o setor agrícola contribui com cerca de 10 a 12% (~5 a 6 Gt CO₂-eq.yr⁻¹ no ano de 2014) do valor total das emissões antropogênicas dos GEE (INTERNATIONAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2014).

O dióxido de carbono é liberado durante a queima de combustível fóssil, produção de fertilizantes sintéticos e pesticidas, pela atividade microbiana, pela queima ou decomposição de resíduos sobre o solo e pela matéria orgânica (LAL, 2004). O metano é produzido pela decomposição anaeróbica da matéria orgânica em turfeiras, lagos, rios e reservatórios, notavelmente a partir fermentação digestiva por animais ruminantes na pecuária e durante o cultivo de arroz alagado (MOISER et al., 1998). O óxido nitroso é gerado pelas transformações microbiana do nitrogênio que ocorre no solo e de adubos adicionados nos mesmos, através dos processos de nitrificação e desnitrificação, ais quais são frequentemente estimulados quando os níveis de N excedem os níveis requeridos pelas plantas, especialmente em condições de alta umidade do solo (SMITH; CONEN, 2004).

O plantio direto (SPD) tem sido promovido como uma pratica agrícola que reduz a erosão do solo e melhora a sustentabilidade agrícola, e concomitantemente a mitigação dos GEE (CARVALHO et al., 2009). O potencial para compensar as emissões dos GEE, está largamente baseada em estudos de mitigação de CO₂, com base em estoque e sequestro de C no solo em sistemas de SPD (WEST; MARLAND, 2002; SALTON et al., 2014).

Six et al. (2004) reportaram alta significância dos efeitos das emissões globais

no balanço dos fluxos dos GEE em sistemas conduzidos sob SPD, especialmente para as mudanças no potencial de aquecimento global ao longo do tempo. A adoção do SPD pode reduzir as emissões GEE e ultrapassar o ganhos adicionados ao acúmulo de C no solo e a estrutura física do solo. No Brasil recentes pesquisas mostram que os sistema em integração lavoura-pecuária (ILP) têm mostrado um potencial em reduzir as emissões de CO₂ para atmosfera (CARVALHO et al., 2014; SALTON et al., 2014).

Politicamente incentivar o SPD e ILP como redutor das emissões dos GEE parece ser uma decisão sábia, mas sem conhecer cientificamente as alterações do SPD e ILP sobre os diferentes regimes sazonais e sucessões de plantas, pode ser um potencial para promover uma teoria sem mérito científico ou até mesmo não resultar de forma eficiente, o que se espera, que é a mitigação dos GEE pela adoção do SPD, podendo causar alterações na política agrícola.

Desta forma, é importante investigar, a longo prazo, os efeitos imediatos das várias estratégias de manejo, como a aplicação de nitrogênio, técnicas agrícolas de precisão, inibidores de nitrificação, e efeito de outros métodos de aplicação de nitrogênio, na redução dos fluxos de N₂O em condições de SPD, com histórico bem definido. Aumentar a adição de fertilizantes nitrogenados, com eficiente uso, durante um maior período, poderá reduzir as perdas em forma de N₂O, assim, isso seria uma situação mais desejável e favorável à produtividade agrícola.

1.4.2 Nitrificação e desnitrificação na agricultura

A conversão entre as diferentes formas de nitrogênio é principalmente realizada por microrganismos (Figura 1.1). A maior quantidade de N é encontrada na atmosfera na forma de gás dinitrogênio. Esse gás pode ser convertido em amônia por organismos simbióticos e de vida livre (Bacteria e Archaea) conhecidos como diazotróficos, os quais podem quebrar a ligação tripla covalente do gás dinitrogênio, Este processo é conhecido como fixação biológica do N₂. A amônia também pode ser oxidado a NO₃⁻ durante o processo de nitrificação. O NO₃⁻ produzido poderá ser reduzido a gás dinitrogênio ou, por meio da redução dissimilatória do NO₃⁻, em amônio (DNRA). Nesse processo, ocorre a formação do N inorgânico, um dos produtos do ciclo do nitrogênio no solo (CANFIELD et al., 2010).

Figura 1.1 – Processos no ciclo do nitrogênio. Adaptado de Canfield et al. (2010)

Algumas reações, tais como: a oxidação anaeróbica do amônio (anammox), onde ocorre a redução do nitrito (NO_2^-) em gás dinitrogênio e a utilização da amônia como doadora de elétrons inorgânico, têm sido descritas por ocorrer em diversos ambientes (KE et al., 2015). Entretanto, não há estudos que comprovem que a anammox desempenha um papel importante no solo.

A amônia e o NO_3^- podem ser usados por muitas células para produzir formas orgânicas de nitrogênio, tais como, proteínas e aminoácidos quais são essenciais para vida. Durante a decomposição da biomassa (plantas, animais, fungos, bactéria), estas formas orgânicas são degradadas e transformadas em amônia (RICHARDSON et al., 2009; BRAKER e CONRAD, 2011).

Fato é que juntos estes processos formam o ciclo do nitrogênio global e os microrganismos são essenciais para a manutenção e balanço entre o nitrogênio que é reduzido ou oxidado (HARTER et al., 2013). Em muitos ecossistemas do solo, o nitrogênio é frequentemente um nutriente limitante para o crescimento das plantas e pode ser perdido pela desnitrificação, erosão do solo, lixiviação e volatilização (SUBBARAO et al., 2006). O nitrogênio perdido, através da volatilização da amônia e pela desnitrificação é um fator significativo para se considerar quando se desenvolve estratégias e manejo do nitrogênio em sistemas agrícolas. Em particular, a desnitrificação conduz à perda de nitrogênio do solo, resultando na liberação do óxido nitroso (N_2O) (HARTER et al., 2013). O protocolo de Kyoto de 1997 estipulou a redução obrigatória de um conjunto de seis gases, incluindo o N_2O (RICHARDSON et al., 2009)

desnitrificação geralmente ocorre em condições anaeróbicas, altos níveis de NO_3^- e na presença de uma fonte de carbono prontamente disponível.

Basicamente a nitrificação é a conversão de amônio (NH_4^+) em nitrato (NO_3^-) via nitrito (NO_2^-). Este processo é promovido por microrganismos quimioautotróficos oxidadores de amônia. As bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e archaea (AOA) (Figura 1.2) oxidam o $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ via uma enzima intermediária conhecida como hidroxilamina (NH_2OH) para NO_2^- (MORALES et al., 2010; ATTARD et al., 2011). Essa enzima é a chave no processo da amônia monoxigenase, que codifica os genes *amoA*. Na oxidação da amônia, podem ser formados N_2O por decomposição química da NH_2OH . No entanto, os níveis de produção de N_2O são geralmente baixos, comparados aos produzidos na etapa seguinte via desnitrificação (CANFIELD et al., 2010; BRAKER e CONRAD, 2011).

Durante a desnitrificação, os microrganismos nitrificantes irão reduzir o nitrato para nitrito, que mais tarde poderá ser reduzido por bactérias desnitrificantes em óxido nítrico (NO). A etapa posterior é catalisada pela enzima nitrato redutase que codifica os genes *nirS* e *nirK* (Figura 1.2) (PHILIPPOT et al., 2013). Os redutores de óxido nítrico convertem o NO para N_2O . Esse gás poderia ser o produto final da desnitrificação ou ser reduzido a N_2 completando o ciclo da desnitrificação. A redução do N_2O para N_2 é catalizada pela enzima óxido nitroso redutase que codifica o gene *nosZ* de bactérias redutoras de N_2O (CANFIELD et al., 2010). Em contraste, a multiplicidade de mecanismos que podem produzir o N_2O , a redução do N_2O para N_2 pode ser somente realizada por microrganismos redutores de óxido nitroso, sendo o único dreno de N_2O microbiano conhecido (JONES et al., 2014).

1.4.3 Potencial dos microrganismos controlarem as emissões de N_2O

O gás N_2O recentemente tem recebido maior atenção, porque é um poderoso gás do efeito estufa que persiste por até 150 anos na estratosfera, enquanto é lentamente destruído (LASSEY et al., 2007). Embora, represente somente 0,03% do total das emissões de gases do efeito estufa, ele tem um poder de aquecimento global 300 vezes maior comparado à capacidade radiativa do CO_2 e causando a depleção da camada de ozônio (RAVISHANKARA et al., 2009). As emissões de N_2O representam aproximadamente a 10% das emissões totais e seu controle na agricultura podem apresentar um desafio considerável (WUEBBLES, 2009). O

desenvolvimento de novas abordagens que aumentem a eficiência agrícola via o potencial de mitigação, devem ser contínuas, e em particular no contexto do desenvolvimento e crescimento da população (GODFRAY et al., 2010). No solo, o N_2O é principalmente produzido através de processos de desnitrificação microbiana ou pela nitrificação, oxidação da amônia a nitrito, produzindo nitrato (CONRAD, 1996). O N_2O pode ser removido pela combinação de dois fatores solo + água e sua redução é catalisada pela enzima que codifica o gene *nosZ* (VIEBROCK; ZUMFT, 1988).

A alta variabilidade espacial nas emissões de N_2O do solo tem sido parcialmente explicadas. A eficiência dos solos em reduzir o N_2O para N_2 também apresenta alta variabilidade. Muitas taxas de redução têm sido observadas em diferentes situações (HERGOUALC'H et al., 2009), apesar da presença do gene *nosZ* em certos casos (JONES et al., 2014). Solos com baixo potencial de redução de N_2O têm também sido observado mesmo em altos níveis de emissão de N_2O em áreas agrícolas (HÉNAULT et al. 2005). Estratégias que visam a mitigação das emissões de N_2O em solos agrícolas podem ser baseada no uso eficiente do N em sistemas de manejo de solo (CARTER et al., 2009) e em ações diretas nos processos microbianos. Inibidores de nitrificação têm sido usados com sucesso para reduzir as emissões de N_2O (BURZACO et al., 2013; DAI et al., 2013), essas emissões N_2O podem ser reduzidas em até 96% (SNYDER et al., 2009).

Hénault e Revellin, (2011) mostraram que o *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 e MSDJ49 pode atuar como dreno das emissões de N_2O . Mais tarde, esses resultados foram confirmados por Itakura et al. (2014), que verificou que as raízes de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* ou organismos geneticamente modificados contendo maior número de genes *nosZ*, foram capazes de mitigar as emissões de N_2O para atmosfera, sugerindo que o cultivo da soja inoculada com *B. japonicum* poderiam reduzir o N_2O e assim diminuir as emissões de N_2O . E, se a engenharia genética fosse utilizada para incrementar o número de cópias do gene *nosZ*, em organismos comercialmente usados como inoculantes de soja, a mitigação poderia ser ainda maior.

Para tanto, algumas pesquisas empíricas não resultaram em reduções nas emissões de N_2O do solo (elas apenas reduziram a entrada de N). Assim, novas opções de mitigação serão, provavelmente, encontradas quando a capacidade biológica e a ecologia dos microrganismos, envolvidos no processo, forem melhor

compreendidas. Os resultados de Itakura et al. (2013) foram os primeiros a indicar o processo de redutase do óxido nítrico como promotor da redução das emissões de N_2O em escala de ecossistema. Esta abordagem, parece ser aplicada a outras culturas de leguminosas tais como a alfafa, a qual mantém relação de simbiose com *Sinorhizobium meliloti* que também tem o gene *nosZ*. Além disso, há um potencial para mitigar as emissões de N_2O pelo uso de vários outros microrganismos contendo o gene *nosZ*.

Harter e colegas (2013) mostram que a a adição de 2% de carvão ao solo (v/v) resultou em redução de 47% do N_2O emitido e, possivelmente, esta redução ocorreu às expensas do aumento da atividade e abundância do gene *nosZ*. Esses resultados sugerem que a mudança na comunidade microbiana capaz de reduzir o N_2O para N_2 , pode mitigar a produção do N_2O .

Outra forma de reduzir as emissões de N_2O para a atmosfera pode ser pela substituição parcial da fertilização nitrogenada pelo uso de leguminosas. As leguminosas, ao adicionarem N fixado pela fixação biológica, reduzem a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais, com ganho econômicos e ambientais (DUSENBURY et al., 2008). Os sistemas de manejo do solo como descritos anteriormente como potenciais meios para reduzir as emissões de GEE. Talvez nos sistemas em ILP, a principal fonte de N_2O no solo na fase de pastagem é a urina e o esterco também contribui para as emissões em menor intensidade (MAGIERO et al., 2010). Isso pode ser explicado pelo fato de que 80-90% do N ingerido pelos animais retorna ao solo via urina e fezes. As emissões de N_2O podem representar 0,4% do N adicionado via urina em Argissolo Vermelho (MAGIERO et al., 2010). No entanto, Salton et al. (2014) e Carvalho et al. (2010) não verificaram maiores emissões em sistemas ILP compara a SPD.

1.4.4 Os efeitos da elevada concentração de CO_2 e temperatura na comunidade microbiana do solo

Os efeitos da fertilização de CO_2 (eC) são bem conhecidos, sem eles o aumento da fotossíntese da planta, crescimento, realocação de recursos e alteração das funções das plantas (DRAKE et al., 2011; van GROENIGEN et al., 2011; ZAK et al., 2011; BISWAS et al., 2013; KUMARI et al., 2013; TWINE et al., 2013, CANADELL; SCHULZE, 2014), mas a magnitude do estímulo do eC pode ser

limitado pela limitação de N suplementado (ZAK et al., 2003; REICH et al., 2006), devido à limitação de N progressiva em condições de eC. Contudo, o impacto do eC na diversidade funcional, composição, estrutura e função da comunidade microbiana é pouco conhecida. Por exemplo, a detecção dos efeitos do eC na estrutura da comunidade microbiana, atividade microbiana, potencial de mineralização ou nitrificação foram observados em *sweetgum* (*Liquidambar styraciflua*) sob *Free Air CO₂ Enrichment* (FACE) na região Sudeste dos Estados Unidos (AUSTIN et al., 2009).

O ciclo do carbono terrestre regula as concentrações de CO₂ através do balanço fotossintético entre as partes assimilada e liberado pela respiração das plantas e acumulado nos resíduos vegetais. O aumento da concentração de CO₂, e concomitantemente o aquecimento global, são susceptíveis às alterações do equilíbrio entre os processos de assimilação e liberação dos GEE, com desconhecidas implicações no acúmulo de C ao longo do tempo.

Altas concentrações atmosféricas de CO₂ e aplicação de fertilizantes, resultam em alta produtividade primária, que é transferida para o solo através do aumento de resíduos e exsudados das raízes (PHILLIPS et al., 2011). No entanto, não está claro se estes insumos podem melhorar e aumentar o estoque de carbono no solo (NORBY; ZAK, 2011), pois o aumento de CO₂ também estimula a perda de C pela respiração a partir de tecidos das plantas e solo (DRAKE et al., 2011).

Além disso, o aquecimento global é consequência da perda de carbono, pelo aumento das taxas de decomposição (HOPKINS et al., 2012). No entanto, o efeito do aquecimento pode ser limitado pela quantidade de substrato disponível para decomposição (DIJKSTRA et al., 2011). Através da interação com a disponibilidade de substrato, o aquecimento global tem o potencial de alterar as respostas do solo, devido à maior reciclagem de resíduos, mesmo em altas concentrações de CO₂. Manipular a concentração de CO₂ e a temperatura num ecossistema tem mostrado que a combinação destes dois condicionadores influencia diferentemente a taxa de reciclagem do carbono orgânico e a composição da comunidade microbiana, que quando mantido somente um dos efeitos (GUTKNECHT et al., 2012; NIE et al., 2012). Contudo, Drigo et al. (2010) mostraram que a elevada concentrações CO₂ resultou em alterações da estrutura e diversidade microbiana e nos processos de reciclagem do C, em resposta as alterações na concentrações de CO₂.

No entanto, Hargety et al. (2014) avaliaram somente os efeitos da

temperatura, observaram que a taxa de reciclagem do C pode ser acelerada em elevada temperatura, e que este fato pode ter ocorrido devido à diminuição do carbono da biomassa microbiana, resultando no aumento do carbono orgânico em um cenário, onde, o crescimento microbiano foi estável durante todo tempo. Resultados similares obtidos por Giardina et al. (2014) mostram que em um experimento de longa duração, a elevada temperatura resultou no aumento da entrada de insumos no solo, concomitantemente, aumentando a respiração do solo, mas sem efeito no C do solo, nem na reciclagem de C.

Anteriormente, as avaliações experimentais, em escala de ecossistemas, a previsão era que o carbono adicional absorvido pelas florestas, com elevação da concentração de CO₂, fosse armazenado no solo (HARRISON et al., 1993). Contudo, dados de experimentos de *Free Air CO₂ Enrichment* (FACE) mostraram uma resposta mista (GRAAFF et al., 2006). Apesar do estímulo consistente da produtividade das plantas em florestas conduzidas em sistemas FACE (NORBY et al., 2005), o aumento da alocação de C no solo sobre elevado CO₂, tinha realmente resultado em menor acréscimo de C armazenado no solo, em alguns experimentos (TALHELM et al., 2009).

Adicionalmente, quando ocorreu maior entrada de material residual, sob elevado CO₂ (eC), observaram reduções na formação de carbono orgânico, que podem ser explicadas pelo decréscimo da retenção da entrada de C mais fresco no solo, ou pela acelerada taxa de decomposição do carbono orgânico (Hargety et al., 2014). Especialmente, eC pode aumentar a fração de C perdida pelo solo através da respiração, pela mudança na eficiência de processos microbianos, tal como a utilização de uma proporção de C para respiração e crescimento (ZIEGLER; BILLINGS, 2011).

Em contraste, eC pode aumentar as perdas de carbono através da decomposição do carbono orgânico via o efeito *priming* pela rizosfera, onde as adições do C exsudados pelas raízes, são facilmente degradadas e estimulariam a atividade microbiana resultando em alta reciclagem do carbono orgânico (KUZYAKOV et al., 2000; CHENG et al., 2013). A Alta taxa de exsudados pelas raízes tem sido observada sobre eC (PHILLIPS et al., 2011), na qual tem aumentado a taxa de respiração do solo (NIE et al., 2012). No entanto, várias fontes de respiração do solo podem realizar a detecção do efeito *priming*, isso em um ecossistema é extremamente desafiador (HOPKINS et al., 2013; PHILLIPS et al.,

2013). Desta forma, ambas explanações reduzem a eficiência microbiana e o efeito *priming* rizosférico, iniciando as mudanças no metabolismo microbiano como condicionador da redução de carbono orgânico sobre eC. Assim, para melhor compreender os condicionadores da decomposição microbiana do carbono orgânico é necessário acessar o efeito do elevado CO₂, sob o estoque de C (BILLINGS et al., 2010).

Sistemas produtivos dependentem largamente de processos ecossistêmicos funcionais, tais como a ciclagem de nutrientes (carbono, fixação de nitrogênio, e desnitrificação) e a decomposição dos resíduos é governada pelos microrganismos e sua dinâmica (MERILES et al., 2009). Contudo, para agrossistemas sustentáveis é necessário o entendimento do efeito da eC na diversidade funcional, composição, estrutura, potencial metabólico e na dinâmica da comunidade microbiana, e em associação com as funções do ecossistema.

Em experimentos de longa duração, o aquecimento pode acelerar a limitação por substratos para os microrganismos tanto para ecossistemas em escalas de campo (MELILLO et al., 2002) quanto em laboratório (FISSORE et al., 2008), e também podem alterar as respostas da temperatura e taxa de respiração microbiana (THIESSEN et al., 2013). Não está claro se os decréscimos observados na respiração microbiana de comunidades sensíveis à temperatura e os efeitos na fisiologia microbiana, são devido a redução da eficiência do uso do substratos (BRADFORD et al., 2008), ou se ocorre diminuição de oferta de substrato microbiano neste ecossistemas.

1.4.5 Interação planta-micro-organismo

Os microrganismos do solo são essenciais para a ciclagem de nutrientes nos ecossistemas. Seu desenvolvimento é influenciado por muitos fatores, tais como tipo do solo (WU et al., 2008; BACH et al., 2010; JANGID et al., 2010), salinidade (LOZUPONE; KNIGHT, 2007; RAJANIEMI; ALISON, 2009) e pH (FIERER; JACKSON, 2006), P (ARAUJO et al., 2014), que podem alterar a distribuição e dinâmica nos ambientes. A vegetação também afeta a composição da comunidade microbiana (CAVIGELLI et al., 1995; CARNEY; MATSON, 2006).

O claro entendimento do relativo impacto destes diferentes fatores no desenvolvimento da comunidade microbiana, pode ser benéfico à obtenção de

isolados ou de comunidades que possam ajudar no desenvolvimento das plantas e vice-versa. Há um crescente reconhecimento de que a vegetação está fortemente associados aos índices de diversidade da microbiota do solo, através de interações diretas ou indiretas (KARDOL; WARDLE, 2010). A vegetação influencia as propriedades físico-químicas do solo, tais como pH, conteúdo de matéria orgânica, teor de fósforo e microclima (KARA et al., 2008). Adicionalmente, os resíduos depositados sob a superfície e os exsudados das raízes suplementam os microrganismos do solo com diferentes níveis, quantidade e qualidade de C provenientes das diferentes plantas.

Mudanças nos fatores podem influenciar a diversidade metabólica dos microrganismos do solo, resultando em um desbalanço em diferentes composições da comunidade microbiana. Embora seja claro o efeito das plantas na estrutura e composição microbiana adjacente às raízes das plantas, não há evidências suficientemente claras para solos agrícolas relatando a composição e estrutura de solos que não margeiam as raízes das plantas. Recentemente, Lange et al. (2015) reportaram claras evidências da diversidade de plantas sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo na região central da Europa. Entretanto, nenhum efeito foi reportado Marshall et al. (2011). Isto sugere que outros fatores podem influenciar a estrutura da comunidade microbiana do solo, atuando de forma independente ou em sinergia com a vegetação (BARBOSA et al., 2014).

Os tipos de manejos dos solos têm impactado a comunidade do solo, e pode levar décadas para se recuperarem (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001). Baseado em um experimento de 12 anos de avaliação, Snapp et al. (2010) concluíram que a intensidade de manejos, foi o principal fator que alterou a comunidade microbiana, e não a diversidade da vegetação. Jangid et al. (2011) acreditam que o experimento de longa duração pode ter mudado a estrutura do solo de maneira que as características de um sistema de uso se tornam únicas. A imigração e interação entre grupos microbianos, que ocorrem durante as fases de sucessão e conversão, promoveram um ambiente único para o desenvolvimento da comunidade. Neste caso, a vegetação pode desempenhar um papel de menor importância sobre a estrutura e composição da comunidade microbiana. No entanto, com amadurecimento dos ecossistemas, as espécies do tipo *r* seriam substituídas pelas espécies *k* estrategistas, e a vegetação poderia influenciar a comunidade microbiana a longo prazo, mas isto iria depender do regime e sucessão de culturas adotada

(FIERER et al., 2006). Isto poderia promover fortes evidências dos estágios de sucessão iniciais podendo ser mais similar a solos cultivados, refletindo o forte impacto dos tipos de manejo e histórico de cultivo. E ao contrário, os sistemas em estágios mais avançados de sucessão podem apresentar uma comunidade microbiana mais similar a ecossistemas maduros como a sistemas de longa duração.

Referências

- ARAÚJO, A.S.F.; BORGES, C.D.; TSAI, S.M.; CESARZ, S.; EISENHAEUER, N. Soil bacterial diversity in degraded and restored lands of Northeast Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 106, n. 5, p. 891–899, 2014.
- ATTARD, E.; RECOUS, S.; CHABBI, A.; DE BERRANGER, C.; GUILLAUMAUD, N.; LABREUCHE, J.; PHILIPPOT, L.; SCHMID, B.; LE ROUX, X. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1975–1989, 2011.
- AUSTIN, E.E.; CASTRO, H.F.; SIDES, K.E.; SCHADT, C.W.; CLASSEN, A.T. Assessment of 10 years of CO₂ fumigation on soil microbial communities and function in a sweetgum plantation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 514–520, 2009.
- BACH, E.M.; BAER, S.G.; MEYER, C.K.; SIX, J. Soil texture affects soil microbial and structural recovery during grassland restoration. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 2182–2191, 2010.
- BARBOSA LIMA, A.; CANNAVAN, F.S.; NAVARRETE, A.A.; TEIXEIRA, W.G.; KURAMAE, E.E.; TSAI, S.M. Amazonian dark earth and plant species from the Amazon Region contribute to shape rhizosphere bacterial communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 69, n. 4, p. 855–866, 2014.
- BARRETTO, A.G.O.P.; BERNDT, G.; SPAROVEK, G.; WIRSENIUS, S. Agricultural intensification in Brazil and its effects on land-use patterns: an analysis of the 1975–2006 period. **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1804–1815, 2013.
- BILLINGS, S.A.; LICHTER, J.; ZIEGLER, S.E.; HUNGATE, B.A.; RICHTER, D.B. A call to investigate drivers of soil organic matter retention vs. mineralization in a high CO₂ world. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 665–668, 2010.
- BISWAS, D.K.; XU, H.; LI, Y.G.; MA, B.L.; JIANG, G.M. Modification of photosynthesis and growth responses to elevated CO₂ by ozone in two cultivars of winter wheat with different years of release. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 6, p. 1485–1496, 2013.

BORGES, C.D.; CORÁ, J.E.; BARBOSA, J.C.; NAHAS, N. Soil microbiological attributes under summer/winter crops rotation in a no-tillage system. **Archives of Agronomy and Soil Science**, Oxford v. 59, n. 13, p. 1471-1485, 2013.

BRAKER, G.; CONRAD, R. Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils - What matters for their functioning? **Advances in applied microbiology**, New York, v. 75, n. 1, p. 33-70.

BRADFORD, M.A.; DAVIES, C.A.; FREY, S.D.; MADDOX, T.R.; MELILLO, J.M.; MOHAN, J.E.; REYNOLDS, J.F.; TRESEDER, K.K.; WALLENSTEIN, M.D. Thermal adaptation of soil microbial respiration to elevated temperature. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, n. 12, p. 1316-1327, 2008.

BRONICK, C.J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, Amsterdam, v. 124, n. 1/2, p. 3-22, 2005.

BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T.M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, n. 1, p. 11-21, 2001.

BURZACO, P.J.; SMITH, D.R.; VYN, T.J. Nitrous oxide emissions in Midwest US maize production vary widely with band-injected N fertilizer rates, timing and nitrapyrin presence. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013.

CANADELL, J.G.; SCHULZE, E.D. Global potential of biospheric carbon management for climate mitigation. **Nature Communication**, London, v. 5, n. 5282, p. 1-12, 2014.

CANFIELD, D.E.; GLAZER, A.N.; FALKOWSKI, P.G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, Washington, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CARNEY, K.M.; MATSON, P.A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 2, p. 226-238, 2006.

CARVALHO, J.L.N. RAUCCI, G.S.; CERRI, C.E.P.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.J.; WRUCK, F.J.; CERRI, C.C. Impact of pasture, agriculture and crop-livestock systems on soil C stocks in Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 175-186, 2010.

CAVIGELLI, M.A.; ROBERTSON, G.P.; KLUG, M.J. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. In: COLLINS, H.P.; ROBERTSON, G.P.; KLUG, M.J. (Ed.). **The significance and regulation of soil biodiversity**. Boston: Kluwer Academic, 1995. p. 99-113.

CHENG, W.X.; PARTON, W.J.; GONZALEZ-MELER, M.A.; PHILLIPS, R.; ASAO, S.; McNICKLE, G.G.; BRZOSTEK, E.; JASTROW, J.D. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. **New Phytologist**, London, v. 201, n. 1, p. 31-

44, 2014.

CLOUGH, T.J.; DI, H.J.; CAMERON, K.C.; SHERLOCK, R.R.; METHERELL, A.K. CLARK, H.; RYS, G. Accounting for the utilization of a N₂O mitigation tool in the IPCC inventory methodology for agricultural soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, London, v. 78, n. 1, p. 1–14, 2007.

CONRAD, R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O and N₂). **Microbiological Review**, Washington, v. 60, n. 4, p. 609–640, 1996.

COOK, R.J. Toward cropping systems that enhance productivity and sustainability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 49, p. 18389-18394, 2006.

DAI, Y; DI, H.J; CAMERON, C.K; HE, J. Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on ammonia oxidizers and N₂O emissions in a grazed pasture soil. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 465, n. 1, p. 125–135, 2013

de GRAAFF, M.A.; van GROENIGEN, K.J.; SIX, J.; HUNGATE, B.; van KESSEL, C. Interactions between plant growth and soil nutrient cycling under elevated CO₂: a meta-analysis. **Global Change Biology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2077-2091, 2006.

DIJKSTRA, P.; THOMAS, S.C.; HEINRICH, P.L.; KOCH, G.W.; SCHWARTZ, E., HUNGATE, B.A. Effect of temperature on metabolic activity of intact microbial communities: evidence for altered metabolic pathway activity but not for increased maintenance respiration and reduced carbon use efficiency. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 2023-2031, 2011.

DRAKE, J.E.; GALLET-BUDYNEK, A.; HOFMOCKEL, K.S.; BERNHARDT, E.S.; BILLINGS, S.A.; JACKSON, R.B.; JOHNSON, K.S.; LICHTER, J.; MCCARTHY, H.R.; McCORMACK, M.I.; MOORE, D.J.P.; OREN, R.; PALMROTH, S.; PHILLIPS, R.P.; PIPPEN, J.S.; PRITCHARD, S.G.; TRESEDER, K.K.; SCHLESINGER, W.H.; DeLUCIA, E.H.; FINZI, A.C. Increases in the flux of carbon belowground stimulate nitrogen uptake and sustain the long-term enhancement of forest productivity under elevated CO₂. **Ecology Letters**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 349–357, 2011.

DRIGO, B.; PIJL, A.S.; DUYTS, H.; KIELAK, A.; GAMPER, H.A.; HOUTEKAMER, M.J.; BOSCHER, H.T.S.; BODELIER, P.L.E.; WHITELEY, A.S.; van VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 24, p. 10938-10942, 2010.

DUNGAIT, J.A.J.; HOPKINS, D.W.; GREGORY, A.S.; WHITMORE, A.P. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. **Global Change Biology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1781-1796, 2012.

DUSENBURY, M.P.; ENGEL, R.E.; MILLER, P.R.; LEMKE, R.L.; WALLANDER, R.

Nitrous oxide emissions from a northern great plains soil as influenced by nitrogen management and cropping systems. **Journal Environmental Quality**, Madison v. 37, n. 1, p. 542-550, 2008.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA. 2005. Disponível em: <<http://www.febrapdp.org.br/historico.htm>>. Acesso em: 28 maio 2014.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FIGUEROLA, E.L.M.; GUERRERO, L.D.; ROSA, S.M.; SIMONETTI, L.; DUVAL, M.E.; GALANTINI, J.A.; BEDANO, J.C.; WALL, L.G.; ERIJMAN, L. Bacterial indicator of agricultural management for soil under no-till crop production. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e51075, 2012.

FISSORE, C.; GIARDINA, C.P.; KOLKA, R.K.; TRETTIN, C.C.; KING, G.M.; JURGENSEN, M.F.; BARTON, C.D.; McDOWELL, S.D. Temperature and vegetation effects on soil organic carbon quality along a forested mean annual temperature gradient in North America. **Global Change Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 193-205, 2008.

GARNETT, T. Livestock-related greenhouse gas emissions: impacts and options for policy makers. **Environmental Science and Policy**, Exeter, v. 12, n. 4, p. 491-503, 2009.

GIARDINA, C.P.; LITTON, C.M.; CROW, S.E.; ASNER, G.P. Warming-related increases in soil CO₂ efflux are explained by increased below-ground carbon flux. **Nature Climate Change**, London, v. 4, n. 1, p. 822-827, 2014.

GODFRAY, H.C.; BEDDINGTON, J.R.; CRUTE, I.R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S.M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, Washington, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GUTKNECHT, J.L.M.; FIELD, C.B.; BALSER, T.C. Microbial communities and their responses to simulated global change fluctuate greatly over multiple years. **Global Change Biology**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 2256-2269, 2012.

HAGERTY, S.B.; van GROENIGEN, K. J.; ALLISON, S.D.; HUNGATE, B.A.; SCHWARTZ, E.; KOCH, G.W.; KOLKA, R.K.; DIJKSTRA P. Accelerated microbial turnover but constant growth efficiency with warming in soil. **Nature Climate Change**, London, v. 4, n. 1, p. 903-906, 2014.

HARRISON, K.; BROECKER, W.; BONANI, G. A strategy for estimating the impact of CO₂ fertilization on soil carbon storage. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 7, n. 1, p. 69-80, 1993.

HARTER, H.; KRAUSE, H.; SCHUETTLER, S.; RUSER, R.; FROMME, M.; SCHOLTEN, T.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Linking N₂O emissions from biochar

amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2013.

HÉNAULT, C.; BIZOUARD, F.; LAVILLE, P.; GABRIELLE, B.; NICOUILLAUD, B.; GERMON, J.C.; CELLIER, P. Predicting in situ soil N₂O emission using NOE algorithm and soil database. **Global Change Biology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 115–127, 2005.

HÉNAULT, C.; REVELLIN, C. Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. **Plant Soil**, The Hague, v. 346, n. 1, p. 289–296, 2011.

HERGOUALC'H, K.; HARMAND, J.M.; CANNAVO, P.; SKIBA, U.; OLIVER, R.; HÉNAULT, C. The utility of process-based models for simulating N₂O emissions from soils: a case study based on Costa Rican coffee plantations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 2343–2355, 2009.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 65–70, 1979.

HOPKINS, F.M.; GONZALEZ-MELER, M.A.; FLOWER, C.E.; LYNCH, D.J.; CZIMCZIK, C.; TANG, J.; SUBKE, J.A. Ecosystem-level controls on root-rhizosphere respiration, **New Phytologist**, London, v. 199, n. 2, p. 339–351, 2013.

HOPKINS, F.M.; TORN, M.S.; TRUMBORE, S.E. Warming accelerates decomposition of decades-old carbon in forest soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 26, p. 1753–1761, 2012.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Summary for policymakers. In: _____. **Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. part a: global and sectoral aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 1–32.

ITAKURA, M.; UCHIDA, Y.; AKIYAMA, H.; HOSHINO, Y.T.; SHIMOMURA, Y.; MORINOTO, S.; TAGO, K.; WANG, Y.; HAYAKAWA, C.; UETAKE, Y.; SÁNCHEZ, C.; EDA, S.; HAYATSU, M.; MINAMISAWA, K. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Nature Climate Change**, London, v. 3, n. 1, p. 208–212, 2013.

JANGID, K.; WILLIAMS, M.A.; FRANZLUEBBERS, A.J.; BLAIR, J.M.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Development of soil microbial communities during tallgrass prairie restoration. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 302–312, 2010.

JANGID, K.; WILLIAMS, M.A.; FRANZLUEBBERS, A.J.; SCHMIDT, T.M.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 2184–2193, 2011.

JANGID, K.; WILLIAMS, M.A.; FRANZLUEBBERS, A.J.; SANDERLIN, J.S.; REEVES, J.H.; JENKINS, M.B.; ENDALE, D.M.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 2843-2853, 2008.

JONES, C.M.; SPOR, A.; BRENNAN, F.P.; BREUIL, M.C.; BRU, D.; LEMANCEAU, P.; GRIFFITHS, B.; HALLIN, S.; PHILIPPOT, L. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. **Nature Climate Change**, London, v. 4, n. 1, p. 801–805, 2014.

KARA, Ö.; BOLAT, I.; ÇAKIROGLU, K.; Öztürk, M. Plant canopy effects on litter accumulation and soil microbial biomass in two temperate forests. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 193-198, 2008.

KARDOL, P.; WARDLE, D.A. How understanding aboveground-belowground linkages can assist restoration ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, n. 11, p. 670-679, 2010.

KE, Y.; AZARI, M.; HAN, P.; GÖRTZ, I.; GU, G.; DENECKE, M. Microbial community of nitrogen-converting bacteria in anammox granular sludge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 103, n. 1, p. 105-115, 2015.

KUMARI, S.; AGRAWAL, M.; TIWARI, S. Impact of elevated CO₂ and elevated O₃ on *Beta vulgaris* L: pigments, metabolites, antioxidants, growth and yield. **Environmental pollution**. England, v. 174, n. 2, p. 279–288, 2013.

KUZYAKOV, Y.; FRIEDEL, J.K.; STAHR, K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1485-1498, 2000.

LAL, R. Carbon emissions from farm operations. **Environmental International**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 981-990, 2004.

LANGE, M.; EUSENHAUER, N.; SIERRA, C.A.; BESSLER, H.; ENGELS, C.; GRIFFITHS, R.I.; MELLADO-VÁZQUEZ, P.G.; MALIK, A.A.; ROY, J., SCHEU, S.; STEINBEISS, S.; THOMSON, B.C.; TRUMBORE, S.E.; GLEIXNER, G. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature Communication**, London, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2014.

LASSEY, D.; HARVEY, M. Nitrous oxide: the serious side of laughing gas. **NIWA Science**, Hamilton, v. 15, n. 2, p. 10–11, 2007.

LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.

MARSHALL, C.B.; McLAREN, J.R.; TURKINGTON, R. Soil microbial communities resistant to changes in plant functional group composition. **Soil Biology and**

Biochemistry, Oxford, v. 43, n. 1, p. 78-85, 2011.

MELILLO, J.M.; STEUDLER, P.A.; ABER, J.D.; NEWKIRK, K.; LUX, H.; BOWLES, F.P.; CATRICALA, C.; MAGILL, A.; AHRENS, T.; MORRISSEAU, S. Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. **Science**, Washington, v. 298, n. 5601, p. 2173-2176, 2002.

MONTGOMERY, D.R. Soil erosion and agricultural sustainability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 33, p. 13268-13272, 2007.

MORALES, S.E.; COSART, T.; HOLBEN, W.E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 6, p. 799-808, 2010.

MOSIER, A.R.; DUXBURY, J.M.; FRENEY, J.R.; HEINEMEYER, O.; MINAMI, K.; JOHNSON, D.E. Mitigating agricultural emissions of methane. **Climatic Change**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 39-80, 1998.

NIE, M.; PENDALL, E.; BELL, C.; GASCH, C.K.; RAUT, S.; TAMANG, S.; WALLENSTEIN, M.D. Positive climate feedbacks of soil microbial communities in a semiarid grassland. **Ecology Letters**, Oxford, v.16, n. 2, p. 234-241, 2013.

NORBY, R.J.; ZAK, D.R. Ecological lessons from free-air CO₂ enrichment (FACE) experiments. **Annual Reviews in Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 181-203, 2011.

NORBY, R.J.; DELUCIA, E.H.; GIELEN, B. Forest response to elevated CO₂ is conserved across a broad range of productivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 50, p. 18052-18056, 2005.

OLIVER, D.P.; BRAMLEY, R.G.V.; RICHES, D.; PORTER, I.; EDWARDS, J. Review: soil physical and chemical properties as indicators of soil quality in Australian viticulture. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Bentley, v. 19, n. 2, p. 129-139, 2013.

PHILLIPS, C.L.; McFARLANE, K.J.; DESAI, A.R. Biological and physical influences on soil ¹⁴CO₂ seasonal dynamics in a temperate hardwood forest. **Biogeosciences**, Berlin, v. 10, p. 7999-8012, 2013.

PHILIPPOT, L.; SPOR, A.; HÉNAULT, C.; BRU, D.; BIZOUARD, F.; JONES, C.M.; SARR, A.; MARON, P.A. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 8, p. 1609-1619, 2013.

_____. Denitrifying genes in bacterial and Archeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1577, n. 3, p. 355–376, 2002.

_____. Denitrification in pathogenic bacteria: For better or worst? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 191–192, 2005.

PHILLIPS, R.P.; FINZI, A.C.; BERNHARDT, E.S. Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO₂ fumigation. **Ecology Letters**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 187-194, 2011.

RAJANIEMI, T.K.; ALLISON, V.J. Abiotic conditions and plant cover differentially affect microbial biomass and community composition on dune gradients. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 102-109, 2009.

RAVISHANKARA, A.R.; DANIEL, J.S.; PORTMANN, R.W. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. **Science**, Washington, v. 326, n. 5949, p. 123–125, 2009.

REICH, P.B.; HOBBIE, S.E.; LEE, T.; ELLSWORTH, D.S.; WEST, J.B.; TILMAN D.; KNOPS, J.M.H.; NAEEM, S.; TROST, J. Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. **Nature**, London, v. 440, n. 1, p. 922–925, 2006.

RICHARDSON, D.; FELGATE, H.; WATMOUGH, N.; THOMSON, A.; BAGGS, E. Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle — could enzymic regulation hold the key? **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 388–397, 2009.

SALTON, J.C.; MERCANTE, F.M.; TOMAZI, M.; ZANATTA, J.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, W.M.; RETORE, M. Integrated crop-livestock system in tropical Brazil: Toward a sustainable production system. **Agricultural Ecosystem and Environmental**, Amsterdam, v. 190, p. 70–79, 2014.

SIX, J.; GLE, S.M.; BREIDT, F.J.; CONANT, R.T.; MOSIER, A.R.; PAUSTIAN, K. The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. **Global Change Biology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 155–160, 2004.

SMITH, K.A.; CONEN, F. Impacts of land management on fluxes of trace greenhouse gases. **Soil Use and Management**, Bedford, v. 20, n. 2, p. 255-263, 2004.

SMITH, P. Land use change and soil organic carbon dynamics. **Nutrient Cycling in Agroecosyst**, London, v. 81, n. 2, p. 169-178, 2008.

SNAPP, S.S.; GENTRY, L.E.; HARWOOD, R. Management intensity e not biodiversity e the driver of ecosystem services in a long-term row crop experiment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 138, n. 3/4, p. 242-248, 2010.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; SAHRAWAT, K.L.; BERY, W.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; WATANABE, T.; SUENAGA, K.; RONDON, M.; RAO, I.M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-challenges and opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, n. 4, p.303-335, 2006.

SNYDER, C.S.; BRUULSEMA, T.W.; JENSEN, T.L.; FIXEN, P.E. Review of

greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. **Agricultural Ecosystem and Environmental**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 247-266, 2009.

TALHELM, A.F.; PREGITZER, K.S.; ZAK, D.R. Species-specific responses to atmospheric carbon dioxide and tropospheric ozone mediate changes in soil carbon. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, n. 1, 1219-1228, 2009.

THIESSEN, S.; GLEIXNER, G.; WUTZLER, T.; REICHSTEIN, M. Both priming and temperature sensitivity of soil organic matter decomposition depend on microbial biomass: an incubation study. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 739-748, 2013.

TWINE, T.E.; BRYANT, J.J.; RICHTER, K.; BERNACCHI, C.J.; McCONNAUGHAY, K.D.; MORRIS, S.J.; ANDREW, D.B. Leakey Impacts of elevated CO₂ concentration on the productivity and surface energy budget of the soybean and maize agroecosystem in the Midwest US. **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 2838-2852, 2013.

van GROENIGEN, K.J.; OSENBERG, C.W.; HUNGATE, B.A. Increased soil emissions of potent greenhouse gases under increased atmospheric CO₂. **Nature**, London, v. 475, n. 1, p. 214-216, 2011.

VIEBROCK, A.; ZUMFT, W.G. Molecular cloning, heterologous expression, and primary structure of the structural gene for the copper enzyme nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 1, p. 4658-4668, 1998.

WEST, T.O.; MARLAND, G. A synthesis of carbon sequestration, carbon emissions, and net carbon flux in agriculture: comparing tillage practices in the United States. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 91, n. 1/3, p. 217-232, 2002.

WU, T.; CHELLEMI, D.O.; GRAHAM, J.H.; MARTIN, K.J.; ROSSKOPF, E.N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 2, p. 293-310, 2008.

WUEBBLES D. Nitrous oxide: no laughing matter. **Science**, Washington, v. 326, n. 5949, p. 56-57, 2009.

YIN, C.T.; JONES, K.L.; PETERSON, D.E.; GARRETT, K.A.; HULBERT, S.H.; PAULITZ, T.C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 2111-2118, 2010.

ZAK, D.R.; PREGITZER, K.S.; KUBISKE, M.E.; BURTON, A.J. Forest productivity under elevated CO₂ and O₃: positive feedbacks to soil N cycling sustain decade-long net primary productivity enhancement by CO₂. **Ecology Letters**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 1220-1226, 2011.

ZAK, D.R.; HOLMES, W.E.; FINZI, A.C.; NORBY, R.J.; SCHLESINGER, W.H. Soil nitrogen cycling under elevated CO₂: a synthesis of forest FACE experiments. **Ecological Applications**, New York, v. 13, n. 6, p. 1508–1514, 2003.

ZIEGLER, S.E.; BILLINGS, S.A. Soil nitrogen status as a regulator of carbon substrate flows through microbial communities with elevated CO₂. **Journal of Geophysical Research Biogeoscience**, Washington, v. 116, n. G1, p. 1-14, 2011.

ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, Washington, v. 61, n. 4, p. 533–616, 1997

2 ESTRUTURA MICROBIANA DO SOLO E GENES FUNCIONAIS DO CICLO DO NITROGÊNIO NO SISTEMA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA APRESENTOU IMPORTANTE MITIGADOR DAS EMISSÕES DE N₂O

Resumo

Uma agricultura especializada resulta em uma produção extensiva de monoculturas, que reduzem a complexidade dos sistemas de manejo, no entanto, diversos impactos ambientais podem ocorrer ao longo do cultivo, como por exemplo, o baixo acúmulo de carbono e a baixa eficiência do uso do nitrogênio pelas plantas. Neste estudo, foi avaliado o efeito dos sistemas de manejo do solo sobre a estrutura da comunidade microbiana e a densidade de genes envolvidos no ciclo do nitrogênio. As amostras de solo foram coletadas na estação experimental de integração lavoura-pecuária da Embrapa-CPAO, instalada desde 1995, sob as mesmas condições, caracterizando o experimento de longa duração. Os genes funcionais foram determinados pela técnica de PCR em tempo real, para os genes nitrificantes (AOB, AOA) e desnitrificantes (*nirS*, *nirK*, *norB* e *nosZ*). A estrutura da comunidade microbiana do solo foi estimada pela técnica de T-RFLP, em quatro sistemas de manejo: sistema convencional (SC), plantio direto (SPD), integração lavoura-pecuária (ILP) e pastagem permanente (PP). Todos os sistemas de manejo foram comparados à vegetação nativa (VN), utilizada como referência. Os resultados mostraram que o número de cópias do gene 16S rRNA foi maior nos sistemas SPD e ILP, os quais também refletiram em uma estrutura microbiana distinta (Sørensen and Bray-Curtis) e α -diversidade. A vegetação nativa afetou a beta-diversidade e o padrão estrutural do nicho. O teste de Spearman mostrou positiva correlação entre a densidade de cópias dos genes AOB e AOA com o número de cópias de Bacteria e Archaea ($r^2 = 0.93$, $p < 0.0001$, $r^2 = 0.71$, $p < 0.0001$), respectivamente. O número de cópias dos genes desnitrificantes respondeu positivamente aos sistemas SPD e ILP. A análise de correspondência canônica mostrou que os sistemas SPD e ILP podem ter melhorado as condições de crescimento dos microrganismos do solo e influenciado e estimulado alguns processos. Estes resultados revelaram que a estrutura da comunidade bacteriana do solo e os genes funcionais foram sensíveis aos tipos de manejo, tais como: SPD e ILP, podem resultar em condições mais favoráveis para a manutenção da estabilidade e resiliência da comunidade microbiana. Foram encontradas fortes implicações em que o sistema ILP pode mitigar as emissões de N₂O para atmosfera, e melhorar os serviços ambientais, além de suportar maior biodiversidade e funcionalidade do solo.

Palavras-chave: Ecologia microbiana do solo; Marcador funcional; Desnitrificação; Ciclo do nitrogênio; Plantio direto; Manejo do solo

Abstract

Specialized agriculture has resulted in extensive production of monocultures, which reduces the complexity of the system management, possibly imposing severe environmental impacts, e.g. lower carbon accumulation and nitrogen use efficiency by the plants. Here, we aimed at investigating the effects of cropping systems on soil bacterial community structures and functional densities of genes involved in the

nitrogen cycle. Soil samples were collected in long-term (20 years) experimental site. We using a quantitative PCR for evaluate gene copy number for nitrifying genes (AOB and AOA) and denitrifying ones (nirS, nirK, cnorB and nosZ). The soil Bacterial community structure were accessed across four distinct crop systems: conventional (CS), no-tillage (NT) and Integrated crop-livestock (ICL) and one permanent pasture (PP). All treatments were compared to a natural vegetation (NV) system, used as a reference. We found higher differences in the copy numbers of the Bacterial and Archaeal 16S rRNA genes in more complex systems, which also reflected in differences in community structures (Sørensen and Bray-Curtis index) and α -diversity. Native vegetation had a strong influence on β -diversity and niche breadth patterns. The genes density AOB, nirS and nosZ responded positively towards a more sustainable system. The data provide convincing evidence that long-term increase potential for ICL mitigated N₂O-emission by high density of *nosZ* gene. Furthermore, our results suggest that phosphorous improvement richness of Bacterial structure and genes associated with key nitrogen cycle, and could thus have long-term consequence for ecosystem functions. This study revealed that microbial community structure in the soil and functional gene densities were sensitive to cropping systems. The cumulative findings have implications that NT and ICL systems improving environmental conditions, and supporting differ soil microbial structure and more abundant, will be useful to further improve N-cycle predictions.

Keywords: Soil microbial ecology; Functional markers; Denitrification; Nitrogen cycle; No-tillage; Soil management

2.1 Introdução

Os modelos agrícolas tradicionais têm mostrado serem ineficientes no uso de energia e resultaram em depleção de seus recursos naturais (SULC; FRANZLUEBBERS, 2014), aliado ao aumento da demanda para produção de alimentos. Algumas projeções, para o ano de 2050, indicam que para garantir a segurança global de alimentos será necessário um incremento de 60 a 110% na produção de alimentos (LAPOLA et al., 2013). A produção de fibra e energia, produtos oriundos de importantes agrossistemas, pode apresentar-se como uma atividade preocupante em relação aos impactos no ambiente.

As práticas de manejo mais sustentáveis, podem ser uma importante alternativa ao sistema convencional (SC), tais como plantio direto (SPD) e Integração lavoura-pecuária (ILP), estando associada a positivos benefícios como o menor distúrbio do solo e entrada de combustível fóssil (FIGUEROLA et al., 2012). Atualmente, o ILP ocupa uma área de 2 milhões de ha, apresentando alto potencial para expansão em áreas de pastagem degradadas, ou com algum tipo de degradação, que se estende por aproximadamente 156 milhões de ha (BARRETO et

al., 2009, 2013).

Juntos, os sistemas o SPD e ILP representam o maior nível de complexidade à se agregar aos sistemas sustentáveis (MARTINELLI, 2012). Uma importante consequência, não intencional, do uso de fertilizantes, é o aumento das emissões de N_2O . Assim, torna-se de suma importância melhorar a eficiência e o uso de N pelas plantas, o qual pode ser feito através dos processos de mineralização, nitrificação e imobilização, evitando perdas pelos processos de emissão e lixiviação (MARTINELLI, 2012).

A comunidade microbiana do solo tem sido útil para elucidar a sua dependência com a dinâmica dos tipos de manejo do solo (LAUBER et al., 2013). Os fatores chave para determinar as modificações na diversidade do solo em sistemas de manejo ainda não estão bem claros. Embora muitos estudos tenham analisado as respostas da densidade de organismos desnitrificantes e sua diversidade em diferentes práticas agrícolas (ATTARD et al., 2011; PETERSEN et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2007), poucos têm focado nos efeitos de longa duração de manejo e menos ainda nos sistemas conduzidos em integração lavoura-pecuária. Outros comparam os efeitos do uso da terra sob a diversidade microbiana (PHILIPPOT et al., 2013; MACDONALD et al., 2014; ARAÚJO et al., 2014) e na densidade de cópias dos genes (MORALES et al., 2010; REEVE et al., 2010; PETERSEN et al., 2012), mas nem sempre esses estudos enumeram os efeitos das mudanças de um sistema para outro.

Estudos recentes revelaram que a abundância e a diversidade de genes funcionais no ambiente, têm sido subestimadas (JONES et al., 2013). Neste contexto, a abundância dos grupos funcionais é de extrema importância e utilidade para predizer os processos o ciclo de nitrogênio (PETERSEN et al., 2012) e a perda da diversidade microbiana, que pode afetar a ciclagem de nitrogênio no solo (PHILIPPOT et al., 2013). Stone e colaboradores (2015) ressaltam que os processos metabólicos refletem nos genes funcionais, e que o declínio de um gene funcional pode estar associado à diminuição da atividade metabólica. Desta forma, o uso de genes funcionais pode ajudar no entendimento dos processos biogeoquímicos, os quais podem ser primeiramente afetados pelos sistemas de manejo do solo (STONE et al., 2015).

Assim, nesse estudo avaliou-se a hipótese em que os sistemas de manejo: i) resultam em uma estrutura microbiana distinta no solo, ii) mas compartilham a

mesma abundância de genes responsivos pela ciclagem de nitrogênio. Desta forma, avaliou-se através dos processos do ciclo do nitrogênio, os sistemas em gradiente: do menor para o maior potencial de sustentabilidade, quanto a composição e a estrutura microbiana; e quantificamos a densidade dos genes *amoA*, *nirK*, *nirS*, *cnorB* e *nosZ*. Estes genes codificam enzimas da ciclagem do nitrogênio, e tem sido usados extensivamente como marcadores moleculares para estudos independente de cultivos solos (LEININGER et al., 2006, PETERSEN et al., 2012).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Caracterização da área experimental

O estudo foi conduzido no campo experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, Município de Dourados-MS (22°16'39.70"S e 54°48'4.92"W), sob solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico típico, com teores de argila, silte e areia 630, 215 e 155g Kg⁻¹, respectivamente. O clima da região, segundo a classificação Cwa, clima úmido com estação quente e chuvosa no verão e seca no inverno (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Temperatura média e precipitação entre os anos 2010 e 2013 na

estação experimental de Embrapa Agropecuária Oeste em Dourados-MS

Os manejos agrícolas foram estabelecidos em 1995, incluindo sistema convencional (SC): monocultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no verão e aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.), no inverno, com uso de grades para o preparo do solo; Sistema plantio direto (SPD): subdividida em três faixas de 2,8 ha cada uma, agricultura conduzida em plantio direto, com soja e milho no verão, rotacionado com trigo (*Triticum aestivum* L.), aveia-preta e nabo forrageiro (*Raphanus raphanistrum* L.) no outono/inverno, contendo as sequências: soja/nabo-forrageiro/milho (*Zea mays* L.), (SPD-a), soja/trigo/soja (SPD-b) e milho/aveia-preta/soja (SPD-c), abrangendo aproximadamente uma área de 8,5 ha (Tabela 2.1). Durante o outono-inverno e/ou primavera as culturas de trigo e aveia-preta foram usadas para a produção de grãos e nabo forrageiro, o qual foi usado para a produção de palha. A disposição das culturas e localização do modelo físico pode ser observada em Salton et al. (2014). Adicionalmente, foram usados dois sistemas naturais da região de Floresta semidecídua amostrados como referência, numa área próxima ao sistema de produção.

A amostragem foi realizada no modelo físico dos sistemas de produção, com uma amostragem espacial que resultou em 25 amostras por faixa com distância de 1-a-300 metros em 2011 e 2012 nas estações de verão e inverno. Procurou-se realizar a amostragem sempre em pleno florescimento das culturas de verão e inverno. Os atributos químicos podem ser observados na Tabela 2.2.

As amostras do solo foram retiradas indeformadas com auxílio de tubos PVC em cada sistema, na profundidade de 0-10 cm, para análises químicas e microbiológicas, e em cada manejo do solo foram amostradas cinco repetições, em cada local amostrado foram retiradas cinco replicas, assim cada repetição foi formada por 5 sub-amostras (5 manejos do solo X 5 repetições X 4 épocas de amostragem) totalizando 100 amostras.

Uma parte do solo foi encaminhada ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (BCM) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP, e armazenados em freezer -20 °C. Segunda parte foi mantida em câmara fria em temperatura de aproximadamente 2-4°C para análises químicas.

Tabela 2.1 – Histórico dos sistemas de manejo da área de estudo no período de 1995-2013, antes de 1995 todas áreas eram cobertas por uma vegetação de Cerrado

Vegetação do Cerrado							
Anos	SC	SPDa	SPDb	SPDc	ILPa	ILPb	PP
1995/6	M	M	M	M	M	M	<i>B. decumbens</i>
	S	S	M	S	S		
1996/7	o	w	o	t	o	<i>B. decumbens</i>	
	S	S	S	M	S		
1997/8	o	t	w	o	o	S	
	S	M	S	S	<i>B. decumbens</i>		
1998/9	o	o	t	w		o	
	S	S	M	S			
1999/0	o	w	o	t	o		
	S	S	S	M		S	
2000/1	o	t	w	o	o	<i>B. decumbens</i>	
	S	M	S	S	S		
2001/2	o	o	t	w	o	S	
	S	S	M	S	<i>B. decumbens</i>		
2002/3	o	w	o	t		o	
	S	S	S	M			
2003/4	o	t	w	o	o		
	S	M	S	S		S	
2004/5	o	o	t	w	o	<i>B. decumbens</i>	
	S	S	M	S	S		
2005/6	o	w	o	t	o	S	
	S	S	S	M	<i>B. decumbens</i>		
2006/7	o	t	w	o		o	
	S	M	S	S			
2007/8	o	o	t	w	o		
	S	S	M	S		S	
2008/9	o	w	o	t	o	<i>B. decumbens</i>	
	S	S	S	M	S		
2009/10	o	t	w	o	o	S	
	S	M	S	S	<i>B. decumbens</i>		
2010/11	o	o	t	w		o	
	S	S	M	S			S
2012/13	o	w	o	t	a		
	S	S	S	M		S	
	o	t	w	o	o	<i>B. decumbens</i>	

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, dividido em três áreas, ILP: integração lavoura-pecuária, dividida em duas áreas, PP: pastagem permanente. Culturas de verão (M: milho, S: soja), e culturas de inverno (o: aveia, w: trigo, t: nabo) e *Brachiaria decumbens*. A amostragem do solo foi realizada com as culturas em negrito

Tabela 2.2 – Atributos químicos do solo em diferentes sistemas de manejo do solo

Tabela 2.2 – Atributos químicos do solo em diferentes sistemas de manejo do solo										
Atributos	SC		SPD		ILP		PP		VN	
	Verão									
pH _(CaCl₂)	4,62	±0,33 ^a	5,01	±0,18	5,06	±0,11	5,23	±0,14	6,06	±0,15
K ⁺ _(mmolc.dm-3)	5,77	±0,33	7,19	±0,75	4,14	±0,41	4,60	±0,60	5,91	±0,82
Ca ⁺⁺ _(mmolc.dm-3)	31,90	±8,56	55,53	±7,93	53,60	±8,39	50,70	±7,00	160,70	±12,10
Mg ⁺⁺ _(mmolc.dm-3)	14,80	±3,68	25,87	±4,63	28,55	±4,00	30,30	±3,15	36,55	±2,31
H+Al _(mmolc.dm-3)	76,50	±7,28	59,57	±10,04	58,55	±3,85	53,60	±6,11	28,95	±4,26
	Inverno									
pH _(CaCl₂)	4,55	±0,13	4,95	±0,19	5,03	±0,13	5,24	±0,11	6,02	±0,21
K _(mmolc.dm-3)	5,16	±0,49	6,62	±0,24	4,56	±1,29	7,28	±1,52	5,56	±1,05
Ca _(mmolc.dm-3)	31,40	±6,73	50,27	±6,61	52,70	±4,97	57,40	±3,85	158,80	±16,28
Mg _(mmolc.dm-3)	13,20	±2,17	21,33	±3,90	25,50	±2,99	31,10	±1,82	36,30	±1,74
H+Al _(mmolc.dm-3)	64,40	±4,87	49,07	±6,42	49,20	±3,76	48,80	±10,62	25,55	±4,58

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: Integração lavoura-pecuária, PP: pastagem permanente, VN: vegetação nativa

^a Desvio padrão

2.2.2 Carbono orgânico, umidade e poros preenchidos por água no solo

O carbono orgânico do solo (CO) foi determinado pelo método de oxidação proposto por Sims e Haby (1971). A umidade do solo foi aferida em 9-12 g de solo a 105°C por 48 h. A densidade do solo e a porosidade da camada superficial foram mensuradas em cada área, em solo indeformado, e usando cilindros de aço inox com 220 cm³. Sendo acessado o oxigênio disponível em cada amostra, e o volume de poros preenchidos por água foi definido como a fração total de poros preenchidos por água, expressa em percentagem (ATTARD et al., 2011):

$$\text{H}_2\text{O nos poros} = (\text{densidade do solo} \times \text{conteúdo de água}) / \text{Porosidade}$$

$$\text{Porosidade} = 1 - (\text{densidade do solo} / \text{densidade de partículas do solo})$$
Os valores de densidade de partícula do solo foram padronizados usando 2.65 g cm³.

2.2.3 Extração de DNA genômico e quantificação dos genes por PCR quantitativo em tempo real

O DNA genômico foi extraído de 0,25 g de solo em triplicatas, usando PowerSoil PowerLyzer DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e armazenado a -20 °C até o uso. Todos os genes usados foram quantificados pela técnica de PCR quantitativo (qPCR),

utilizando o StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As reações continham 10 μL , 1 μL de BSA, 5,5 μM de cada primer, 5 μL de qPCR SYBR master mix 2x (fermentas) e 10 a 20 ng do DNA. As condições ótimas para qPCR foram definidas como 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 2.3) por 40 segundos, e a aquisição de fluorescência foi realizada a 72 °C, por 40 segundos, para todos os conjuntos de *primers*. Os genes *nirS*, *nirK* e *cnorB_B* foram inicialmente submetidos a 6 ciclos em temperatura decrescente (Tabela 2.3), por 40 segundos, e ao final de cada reação foi conduzida uma curva de *melting* de 50 a 99 °C, com aumento de 0.5 °C por 10s. A especificidade de todos os conjuntos de primers foi checada pela observação de um único pico de *melting*, confirmando a pureza dos produtos amplificados. Adicionalmente, foram corridos gel de agarose (1%) para confirmação do tamanho dos amplicons. Os amplicons dos genes foram obtidos de clones de amostras ambientais por PCR usando os *primers* (Tabela 2.3) purificados com Kit GFX e ligados em um vetor pGEM-T (Promega). Os vetores contendo os incertos foram transformados com células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Promega). Para a quantificação e obtenção de uma curva padrão, os incertos clonados foram re-amplificados usando *primers* (Tabela 2.3), onde os clones foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão com uma diluição seriada de 10^2 a 10^7 genes μL^{-1} , e triplicatas com diluição seriada de 10 vezes do clone ambiental. Também foram usados organismos padrão com controle positivo *Paracoccus denitrificans* (DSM 413) *Pseudomonas fluorescens* (DSM 6506). O número de cópias dos genes foi apresentado por gramas de solo.

2.2.4 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do Gene 16S rRNA de Bactéria

A estrutura microbiana do gene 16S rRNA foi amplificado usando os *primers* 27f e 1492r (SINGH et al., 2006), onde o 27f foi marcado com 6-carboxyfluorescein (FAM). A reação de PCR foi realizada contendo no mix 1 x Taq Platinum PCR tampão, 3 μL de MgCl_2 , 0.2 μL de cada dNTP, 0.2 pmol/ μL de cada *primer* e 0.05 U/ μL de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As condições de reação foram 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 30 s, e 72 °C por 10 min. O produto do PCR foi purificado usando o kit GFX conforme as

instruções do fabricante. Sessenta nanogramas do DNA amplificado foram usados para realizar a reação de digestão em 20 µl, usando as enzimas *Hha* I e *Msp* I (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante para a digestão. O produto foi precipitado em 15 min a 16 000 giros em temperatura ambiente, gentilmente adicionou-se 2 µl de acetato de sódio (pH 5.2) + EDTA e 150 µl de etanol (100%, v/v), e em seguida retirou-se o sobrenadante (os peletes foram lavados com etanol (70%, v/v), dissolvido em água destilada), a ressuspensão foi feita em 9.8 µl de formamida HiDi com 0.2 µl de GeneScan-500 ROX, padrão interno (Applied Biosystems, USA), e desnaturado a 94 °C por 5 min, e imediatamente transferido para um rack de gelo para perfazer o choque térmico. Os fragmentos foram separados em um sequenciador automatizado ABI 3031 (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. O tamanho e a intensidade de cada T-RFs (Hereafter named phylotype) foram analisados usando GeneMapper Software v 4.1 (Applied Biosystems).

Tabela 2.3 – Marcadores usados no qPCR quantitativo e condições térmicas

Primers	Grupo	Sequencia (5'-3')	Condições térmicas °C	Nº de ciclos	Referências
Bac 968 Bac 1387	Bacteria	AAC GCG AAG AAC CTT AC GGG CGG WGT GTA CAA GGC	95 °C-15s/ 56 °C 15s/ 72 °C 40s	40	MARCHESI et al., (1998)
Arch787F Arch1059R	Archaea	ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC GCC ATG CAC CWC CTC T	95 °C-15s/ 61 °C 15s/ 72 °C 40s	40	YU et al. (2005)
amoA-1F amoA-2R	AOB	GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	95 °C-15s/ 53 °C 15s/ 72 °C 40s	40	ROTHAUWE et al. (1997)
Arch-amoAF Arch-amoAR	AOA	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT	95 °C-15s/ 55 °C 15s/ 72 °C 40s	40	FRANCIS et al. (2005)
nirScd3aF nirSR3cd	nirS	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG AST TCG GRT GSG TCT TGA	95 °C-15s/ 63 °C 40s/ 72 °C 40s 95 °C-15s/ 57 °C 40s/ 72 °C 40s	6 ^a 40	THROBACK et al. (2004)
nirK1F nirK5R	nirK	GGM ATG GTK CCS TGG CA GCC TCG ATC AGR TTR TGG	95 °C-15s/ 48 °C 40s/ 72 °C 40s 95 °C-15s/ 42 °C 40s/ 72 °C 40s	6 ^a 40	THROBÄCK et al. (2004)
cnorB _g F cnorB _g R	cnorB	AIG TGG TCG AGA AGT GGC TCT A TCT GIA CGG TGA AGA TCA CC	95 °C-15s/ 65 °C 40s/ 72 °C 40s 95 °C-15s/ 59 °C 40s/ 72 °C 40s	6 ^a 40	DANDIE et al. (2007)
nosZ2F nosZ2R	nosZ	CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA	95 °C-15s/ 66 °C 40s/ 72 °C 40s 95 °C-15s/ 61 °C 40s/ 72 °C 40s	6 ^a 40	HENRY et al. (2006)
Lgc353 Eub518r	Firmicutes	GCA GTA GGG AAT CTT CCG ATT ACC GCG GCT GCT GG	95 °C-15s/ 60 °C 40s/ 72 °C 40s	40	FIERER et al. (2005)
Act920F3 Act1200R	Actinobacteria	TAC GGC CGC AAG GCT A TCR TCC CCA CCT TCC TCC G	95 °C-60s/ 50 °C 40s/ 72 °C 60s	40	GREGORIS et al. (2011)
Ver53 Eub518	Verrucomicrobia	TGGCGGCGTGGWTAAGA ATTACCGCGGCTGCTGG	95 °C-60s/ 49 °C 40s/ 72 °C 60s	40	FIERER et al. (2005)

^aTouchdown PCR, diminui 1°C por ciclo. **K**= G+T; **S**= G+C; **M**= A+C; **R**= A+G. Os clones ambientais foram oriundos de bibliotecas existentes dentro do laboratório

2.2.5 Análise estatística

O conjunto de dados de qPCR, foram submetidos a repetidas análises pelo modelo *linear mixed effects (lme)* usando pacote '*lme4*' no R. Os dados foram analisados usando as épocas de amostragem e suas interações foram considerados efeitos randômicos, e os tipos de manejo e o efeito sazonal foram considerados como efeito fixo. O efeito randômico não significativo foi removido automaticamente da análise. Um modelo reduzido foi calculado gerando os contrastes pela função *diffsmeans* do pacote R '*lmerTest*' (FIGUEROLA et al., 2014). Quando detectamos o efeito significativo dos valores de p, as medias foram constratadas usando Tukey *honestly significance test* (TukeyHSD) (p<0.05) usando o pacote R '*agricolae*'. A estimativa do índice de α -diversidade, equitabilidade e β - diversidades de Whittaker foram aplicadas com 9999 permutações usando o índice de similaridade Bray-Curtis.

A análise dos dados para o PCR quantitativo foi transformada em $\log_{10}$ para satisfazer os requerimentos de normalidade quando necessário.

Os fragmentos do T-RFLP, aqui denominados de TRFs foram padronizados através da conversão em valores proporcional e normalizados pelo tipo de manejo e pela alta contribuição das TRFs eminente, as quais foram transformadas em $\log_{10} (x + 1)$ (RAMETTE, 2007). A variação na estrutura e composição dos tipos de manejo na comunidade microbiana foi caracterizada usando os índices de similaridade Sørensen e Bray-Curtis, respectivamente (McCUNE; GRACE 2002; THEIS et al., 2012). E a dissimilaridade entre as comunidades foram visualizadas através da análise de componentes principais (PCA), e estatisticamente avaliadas via similaridade (ANOSIM e SIMPER). A análise de SIMPER serviu para elucidar a contribuição de cada UTO, dos grupos analisados. Também avaliamos através do teste da PERMANOVA dados multivariados, não-paramétricos, através do teste de permutação, as diferenças entre as estrutura e composição das comunidades nos sistemas de manejo predefinidos. Esses conjunto de análises foram feitos usando o PAST (v.3.01) (HAMMER et al., 2001). O *niche breadth* foi calculado pelo método de Levins usando a função *niche.width* com pacote 'sppa' R baseado nas TRFs.

Finalmente, os dados de qPCR e T-RFLP foram ordenados na análise de correspondência canônica (CCA) feita usando o pacote 'vegan' no R combinado com a análise de redundância, e calculados a partir da distância de Bray-Curtis e a transformação usando o método de Hellinger no programa R (LAMMEL et al., 2014).

2.3 Resultados

2.3.1 Propriedades químicas e físicas dos solos

A análise dos poros preenchidos por água resultou em alto conteúdo no sistema plantio direto (SPD), a integração lavoura-pecuária (ILP) e pastagem permanente (PP), do que no sistema convencional (SC) e vegetação nativa (VN) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Poros preenchidos por água em diferentes sistemas de manejo do solo (SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa). Boxplot dos valores médios da primeira e segunda amostragem em cada estação sazonal. Pontos circulares são *outliers*

Baixos teores de nitrogênio foram observados no SC para ambas as estações de amostragem (verão $164,96 \pm 33,75$, inverno $164,51 \pm 4,74$, média $\pm$ d.p.) g.k^{-1} (Tabela 2.4). Similarmente, baixos teores de amônio ($12,41 \pm 0,51$) foram observados no SPD no verão, e SC ($18,11 \pm 1,08$) no inverno. O nitrato seguiu a mesma tendência, com valores mais baixos em SPD (verão $6,93 \pm 0,42$) e SC (inverno $12,21 \pm 1,92$) (Tabela 2.4). Já os menores conteúdos de carbono orgânico total no solo foram encontrados no SC, em ambos os períodos de amostragem do solo (verão $11,97 \pm 1,48$, inverno $14,95 \pm 0,69$). Os mais baixos teores de fósforo disponível foram encontrados em VN (verão $22,8 \pm 0,80$, inverno $22,1 \pm 1,13$) e PP (verão $23,8 \pm 4,93$, inverno $21,1 \pm 2,72$) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Teores na camada 0 a 10 cm de profundidade do solo de nitrogênio total (NT), amônia (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), carbono orgânico (CO) e fósforo (P) em diferentes sistemas de manejo do solo

Sistemas de Manejo	NT (g Kg ⁻¹) ^α		NH ₄ ⁺ (mg Kg ⁻¹) [‡]		NO ₃ ⁻ (mg Kg ⁻¹) [‡]		CO (g Kg ⁻¹) ^β		P (mg.dm ⁻³) ^δ	
	Verão									
SC	164,96	±33,75 ^δ	22,02	±2,92	12,21	±1,92	11,97	±1,48	42,71	±3,40
SPD	190,68	±16,55	12,41	±0,51	6,93	±0,42	14,22	±0,73	84,30	±4,04
ILP	203,06	±10,21	26,52	±1,22	14,56	±0,79	16,29	±1,10	38,73	±4,01
PP	200,55	±20,57	24,65	±5,81	13,43	±3,36	18,32	±1,38	23,82	±4,93
VN	425,06	±13,99	53,67	±4,38	29,44	±2,27	30,40	±3,11	22,81	±0,80
	Inverno									
SC	164,51	±4,74	18,11	±1,08	9,32	±0,91	14,95	±0,69	37,10	±2,13
SPD	184,63	±8,77	21,55	±0,98	11,43	±0,58	17,60	±0,63	83,81	±17,10
ILP	193,79	±13,81	22,87	±1,59	11,81	±0,93	20,55	±1,58	33,43	±3,60
PP	230,96	±8,96	27,73	±1,30	14,92	±0,74	24,51	±1,12	21,12	±2,72
VN	440,28	±4,59	52,35	±5,89	28,62	±3,52	43,35	±7,20	22,11	±1,13

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem e VN: vegetação nativa

^δValores médios da de duas amostragens em cada período sazonal, média ± desvio padrão.

^aNitrogênio total.

^tAmônio.

^tNitrato.

^βCarbono orgânico .

^δFósforo

2.3.2 Densidade de genes de archaea, bactéria e estrutura microbiana do solo

A comunidade de bactéria apresentou elevada abundância de cópias do gene 16S rRNA, em todos cinco tipos de manejo, na amostragem de inverno, oscilando 3-6 vezes mais que no verão (Figura 2.3). A abundância de archaea, de SPD para PP, resultou em uma redução drástica de aproximadamente 95% no número de cópias (Figura 2.3). A abundância de cópias de *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* foi reduzida no solo cultivado com SPD e ILP, durante a estação de inverno, mas o solo cultivado em sistemas SC, PP e NV aumentaram ($p < 0.05$) o número de cópias de seus respectivos genes na estação de verão (Figura 2.4).

Figura 2.3 – Número de cópias dos genes de Bacteria e Archaea em diferentes sistemas de manejo do solo (SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa). Diferentes letras entre os sistemas de manejo (barras branco no período de verão, cinza no inverno) indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Figure 2.4 – Abundância relativa dos grupos taxonômicos amplificados com conjunto de primers específico para *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* em ambas estações sob diferentes sistemas de manejo (SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa)

A ordenação da *nonmetric multidimensional scaling* (NMDS) das TRFs mostraram efeito significativo dos sistemas de manejo sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo em ambos os períodos analisados (Figura 2.5). O teste ANOSIM resultou em altos valores, e foi altamente significativo pelos índices de Sørensen e Bray-Curtis para a estrutura microbiana devido ao tipo de manejo adotado, exceto a composição de Sørensen nos solos SC vs SPD no verão (Tabela 2.5).

Figura 2.5 - *Nonmetric multidimensional scaling* (NMDS) baseado no padrão das Bacteria em diferentes sistemas de manejo do solo (SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa). No verão (PERMANOVA $p < 0.0001$, $F = 14,46$) e no inverno (PERMANOVA $p < 0.0001$, $F = 19,98$). A análise PERMANOVA foi feita com 999 permutações usando o índice de Bray-Curtis entre os sistemas de manejo. N (Nitrogênio total), as isolinhas indicam os valores de gradiente do P (Fósforo)

Tabela 2.5 – Teste ANOSIM do gene 16S rRNA baseado no perfil de T-RFLP nos diferentes sistemas de manejo

Sistemas de Manejo	Sørensen				Bray-Curtis			
	Verão		Inverno		Verão		Inverno	
	R	p<	R	p<	R	p<	R	p<
SC vs SPD	0,41	0,0004	0,47	0,0011	0,12	0,1777	0,77	0,0002
SC vs ILP	0,19	0,1059	0,65	0,0007	0,25	0,0393	0,47	0,0032
SC vs PP	1,00	0,0096	0,90	0,0073	1,00	0,0072	0,85	0,0078
SC vs VN	1,00	0,0004	0,92	0,0008	1,00	0,0007	0,97	0,0011
SPD vs ILP	0,42	0,0001	0,32	0,0004	0,48	0,0003	0,35	0,0005
SPD vs PP	0,87	0,0001	0,65	0,0003	0,97	0,0001	0,65	0,0001
SPD vs VN	0,99	0,0001	0,79	0,0001	1,00	0,0001	0,86	0,0001
ILP vs PP	0,11	0,2014	0,13	0,1576	0,07	0,2858	0,17	0,1209
ILP vs VN	0,65	0,0001	0,74	0,0001	0,60	0,0002	0,68	0,0001
PP vs VN	0,95	0,0007	0,68	0,0007	0,83	0,0003	0,61	0,0004
Global	0,66	0,0001	0,60	0,0001	0,63	0,0001	0,63	0,0001

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

A riqueza foi alta nos solos sob o sistema SPD ($52,57 \pm 2,72$, média $\pm$ desvio padrão) e SC ($56,20 \pm 1,27$) no verão, e no inverno os solos conduzidos em sistema PP ($55,90 \pm 0,10$) e CS ($55,20 \pm 0,54$) aumentaram a riqueza comparada à ILP ($48,00 \pm 0,23$). A estimativa dos índices de Shannon e Simpson resultou em altos ($p < 0,05$) índices nos solos sob PP ($3,41 \pm 0,16$) e ILP ($3,08 \pm 0,19$) durante o verão, e sem efeito significativo no período de inverno (Tabela 2.6). A avaliação da equitabilidade mostrou-se sensível em diferenciar os sistemas de manejo, resultando em maiores índices para ILP ($0,88 \pm 0,02$), PP ($0,90 \pm 0,02$) e NV ($0,92 \pm 0,02$) no verão, e o baixo valor para equitabilidade foi verificado no sistema PP ($0,82 \pm 0,03$) na estação de inverno (Tabela 2.6). A estimativa da beta-diversidade resultou em menores índices no SC na amostragem de verão (0,65) e inverno (0,63) quando comparado à vegetação nativa (Tabela 2.7). O cálculo do *Niche Breadth* demonstrou significativo e alto número de TRFs ocorrem nos sistemas de manejo (25 a 30) que na VN (19), os baixos valores revelando baixo distúrbio no habitat na VN (Tabela

2.7), e alta correlação com o índice de Shannon (Figura 2.6). A composição das TRFs com maior contribuição para separar os sistemas de manejo foram TRFs 79, 122, 191 e 279 no verão e TRFs 91, 192, 279 para época de inverno (Tabela 2.8).

Tabela 2.6 – Riqueza, índice de diversidade e equitabilidade calculados com pacote *vegan* para o padrão de TRFs nos diferentes sistemas de manejo. Diferentes letras, entre os sistemas de manejo, indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey. Valores médios $\pm$ desvio padrão

Sistemas de Manejo	TRFs	Riqueza	Simpson	Shannon	Equitabilidade
Verão					
SC	63 $\pm 5,94^a$	56,20a $\pm 1,27$	0,91bc $\pm 0,01$	3,06b $\pm 0,15$	0,77c $\pm 0,02$
SPD	63 $\pm 8,93$	52,57a $\pm 2,72$	0,91bc $\pm 0,02$	3,04b $\pm 0,25$	0,81b $\pm 0,02$
ILP	51 $\pm 13,09$	38,60b $\pm 2,31$	0,93ab $\pm 0,01$	3,08ab $\pm 0,19$	0,88a $\pm 0,02$
PP	49 $\pm 5,16$	42,70b $\pm 2,56$	0,95a $\pm 0,01$	3,41a $\pm 0,16$	0,90a $\pm 0,02$
VN	37 $\pm 6,40$	30,95c $\pm 2,25$	0,88c $\pm 0,08$	2,83b $\pm 0,43$	0,92a $\pm 0,02$
Inverno					
SC	73 $\pm 15,43$	55,20a $\pm 0,54$	0,95a $\pm 0,01$	3,61a $\pm 0,09$	0,85ab $\pm 0,03$
SPD	65 $\pm 10,93$	49,93b $\pm 0,30$	0,94a $\pm 0,02$	3,55a $\pm 0,25$	0,86ab $\pm 0,04$
ILP	61 $\pm 10,23$	48,00b $\pm 0,23$	0,94a $\pm 0,02$	3,52a $\pm 0,27$	0,87a $\pm 0,04$
PP	75 $\pm 5,65$	55,90a $\pm 0,10$	0,94a $\pm 0,01$	3,52a $\pm 0,09$	0,82b $\pm 0,03$
VN	70 $\pm 8,67$	49,45b $\pm 0,48$	0,96a $\pm 0,01$	3,68a $\pm 0,15$	0,87a $\pm 0,03$

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

Figura 2.7 – Beta-diversidade e taxa de distúrbio calculado pelo índice *niche breadth* nos diferentes sistemas de manejo do solo. Diferentes letras, entre os sistemas de manejo, na coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey

Sistemas de Manejo	Beta-diversidade		<i>Niche breadth</i>	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
SC	0,65	0,63	25,98ab	27,56a
SPD	0,91	0,76	24,73ab	24,14a
ILP	0,92	0,77	28,42a	26,08a
PP	0,76	0,74	29,87a	23,15a
VN	1,06	0,70	19,40b	27,83a

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

Figura 2.6 – Correlação entre índice de Shannon e Widely dirturbuted taxa

Tabela 2.8 – Análise de SIMPER indicando a contribuição de específicas TRFs na separação dos sistemas de manejo do solo

Sistemas de Manejo	Verão			Inverno		
	Dissimilaridade	TRFs ^β	% ^δ	Dissimilaridade	TRFs	%
SC vs SPD	48,28 ^α	79	19,07	50,76	91	9,74
		122	7,16		192	9,41
		191	5,72		279	6,27
		279	4,71		234	4,11
SC vs ILP	75,9	79	21,99	49,57	91	8,18
		122	8,11		192	7,61
		191	4,66		279	4,71
		279	4,40		79	2,66
SC vs PP	63,74	79	18,85	57,01	192	8,58
		122	6,81		279	5,85
		191	3,73		91	5,73
		239	3,47		79	3,06
SC vs VN	87,72	79	22,63	61,35	192	9,21
		122	8,72		279	5,98
		191	4,47		91	3,62
		279	4,42		295	2,66

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

^α Média global de dissimilaridade

^β Quatro TRFs mais influenciadas

^δ Contribuição % da dissimilaridade entre os sistemas de manejo

2.3.3 Densidade de genes funcionais

A densidade de archaea nitrificante (AOA) foi mais abundante no SPD (4.24×10^7 , cópias g^{-1} de solo seco) que em PP (3.45×10^5) na época de verão. Na amostragem de inverno a densidade de bactéria nitrificante (AOB) resultou em declínio ($p < 0.05$) de SC (72%), PP (74%) and VN (80%), quando comparados ao SPD no verão. O número de cópias de AOB no inverno resultou em alta ($p < 0.05$) abundância no inverno no SPD (Tabela 2.9). O aumento do número de cópias do gene AOA e AOB foi correlacionado ($r^2 = 0,93$, $p < 0.0001$, $r^2 = 0,71$, $p < 0.0001$, Pearson) com a abundância de cópias de Archaea e Bacteria no verão, respectivamente.

A abundância do gene desnitrificante *nirS* resultaram em maiores densidade

nos sistemas SPD ($2.24E+06$) e ILP ($9.86E+05$) que SC ($8.94E+05$), PP ($1.35E+05$) and VN ($5.58E+05$), no período de verão, mas no inverno VN ($1.25E+05$) ocorreram ou mostrou altas densidades ($p < 0.05$). A abundância dos genes *nirK* resultaram em alta densidade no sistema VN que em outros sistemas de manejo no verão, mas no inverno SPD e PP mostraram baixas densidades (Tabela 2.9). O número de cópias do gene *cnorB* resultou em altas densidades no sistema ILP e PP em ambas as estações de amostragem solo. A densidade do gene *nosZ* aumentou ($p < 0.05$) no sistema SPD em ambas as épocas sazonais, exceto no verão o ILP também teve sua abundância incrementada (Tabela 2.9).

A relação entre a estrutura da comunidade microbiana e grupos funcionais foram ordenamos pela CCA, os grupos funcionais foram selecionados com base $p > 0.05$ e ajudaram explicar as associações entre SPD com AOA, AOB, *nirS*, *nirK*, *nirK+nirS* e *nosZ*. O sistema ILP teve melhores relações com *nosZ/nirK* no verão. Já para o inverno o SPD apresentou melhores relação com AOB, *nosZ*, *nosZ/nirS*, *nosZ/nirK*, e ILP apresentou forte contribuição do gene *cnorB*, ja a VN com AOA *nirS* (Figure 2.7), esses efeitos foram avaliados pela PERMANOVA ($p < 0.0001$, verão $F = 51,14$, inverno $F = 171,10$).

Tabela 2.9 – Detecção de específicos grupos funcionais do ciclo do nitrogênio em diferentes sistemas de manejo do solo. Diferentes letras entre os sistemas de manejo na coluna, indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey

Sistemas de Manejo	Nitrificantes ^δ				Denitrificantes ^δ							
	AOA		AOB		<i>nirS</i>		<i>nirK</i>		<i>cnorB</i>		<i>nosZ</i>	
	Verão											
SC	1.36E+07 ^α	bc ^β	7.04E+05	b	8.94E+05	b	1.17E+05	c	1.5E+05	b	1.4E+06	b
SPD	4.24E+07	a	2.53E+06	a	2.24E+06	a	2.44E+05	bc	1.4E+05	b	2.5E+06	a
ILP	2.50E+07	ab	1.43E+06	a	9.86E+05	a	7.21E+05	b	3.4E+05	a	2.4E+06	a
PP	3.45E+05	c	6.46E+05	b	1.35E+05	c	2.93E+05	bc	2.5E+05	a	9.8E+05	c
VN	3.33E+07	a	4.90E+05	b	5.58E+05	b	1.59E+06	a	1.3E+05	b	1.4E+06	b
	Inverno											
SC	4.47E+06	b	1.74E+04	b	9.88E+04	b	2.73E+06	ab	8.3E+04	ab	8.3E+06	b
SPD	1.13E+07	b	3.12E+05	a	1.75E+05	ab	3.56E+06	a	7.1E+04	b	9.7E+06	a
ILP	5.76E+06	b	3.17E+04	b	6.90E+04	b	3.19E+06	ab	1.1E+05	a	5.0E+06	b
PP	8.19E+05	b	6.43E+04	b	9.12E+04	b	1.67E+06	b	9.4E+04	a	1.2E+06	b
VN	2.67E+07	a	2.62E+04	b	1.25E+05	a	1.70E+06	b	4.8E+04	c	6.3E+06	b

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

^oCópia por grama de solo.

^aValores médios da primeira e segunda amostragem.

Figura 2.7 – Análise de correspondência canônica (CCA) da estrutura da comunidade microbiana solo baseado baseado nas TRFs do gene 16S rRNA e genes funcionais, nos diferentes sistemas de manejo do solo (SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa). Eixos horizontal e vertical no verão representam 32% e 19%, respectivamente, da variância observada e o teste da PERMANOVA $p < 0.001$, $F = 51,14$. E no inverno o eixo horizontal e vertical representam 32% e 18%, respectivamente, da variância observada, e o teste da PERMANOVA $p < 0.0001$, $F = 171,10$. A análise da PERMANOVA foi realizada usando 999 permutações com índice de Bray-Curtis entre os diferentes sistemas de manejo do solo. A estrutura microbiana do solo (TRFs) com AOA, AOB, *nirS*, *nirK*, *cnorB*, *nosZ*, *nosZ/nirK*, *nosZ/nirS* (cópias do gene g^{-1} de solo seco)

No verão, os sistemas com maior complexidade mostraram maior dissimilaridade entre SC vs SPD (49%), SC vs ILP (51%) e SC vs PP (75%) (Tabela 2.10). E o gene ou os genes? que mais contribuiu para a dissimilaridade entre os sistemas de manejo foi o AOA, resultando em SC vs SPD (86%), SC vs ILP (79%), SC vs PP (84%) e SC vs VN (90%) (Tabela 2.10). Por outro lado, no período do inverno a menor contribuição de dissimilaridade foi verificada entre os sistemas SC vs ILP (31%), e os genes com maior contribuição para dissimilaridade entre os sistemas de manejo foram AOA e *nosZ*, com contribuições de SC vs SPD (*nosZ*, 90%), SC vs ILP (AOA, 44%), SC vs PP (*nosZ*, 54%) e SC vs VN (AOA, 83%) (Tabela 2.10).

Tabela 2.10 – Contribuição de específicos genes do ciclo do nitrogênio observados nos diferentes sistemas de manejo do solo

Sistemas de Manejo	Verão			Inverno		
	Dissimilaridade ^α	Genes ^β	% ^δ	Dissimilaridade	Genes	%
SC vs SPD	49,56	AOA	86,48	72,58	<i>nosZ</i>	90,74
		AOB	5,55		AOA	7,70
		<i>nirS</i>	4,10		<i>nirK</i>	1,03
		<i>nosZ</i>	3,41		AOB	0,38
		<i>nirK</i>	0,39		<i>nirS</i>	0,09
		<i>cnorB</i>	0,05		<i>cnorB</i>	0,04
SC vs ILP	51,62	AOA	79,95	31,16	AOA	44,71
		<i>nosZ</i>	7,55		<i>nosZ</i>	29,59
		AOB	4,94		<i>nirK</i>	23,91
		<i>nirK</i>	2,99		<i>cnorB</i>	0,98
		<i>cnorB</i>	2,37		<i>nirS</i>	0,45
		<i>nirS</i>	2,18		AOB	0,35
SC vs PP	75,92	AOA	84,85	60,95	<i>nosZ</i>	54,02
		<i>nirS</i>	5,43		AOA	31,86
		<i>cnorB</i>	4,12		<i>nirK</i>	10,73
		<i>nosZ</i>	3,34		<i>cnorB</i>	2,68
		<i>nirK</i>	1,28		AOB	0,40
		AOB	0,97		<i>nirS</i>	0,30
SC vs VN	57,10	AOA	90,21	64,08	AOA	83,85
		<i>nirK</i>	5,93		<i>nosZ</i>	12,51
		<i>nosZ</i>	2,57		<i>nirK</i>	3,24
		AOB	0,53		<i>nirS</i>	0,24
		<i>nirS</i>	0,52		<i>cnorB</i>	0,08
		<i>cnorB</i>	0,21		AOB	0,06

SC: sistema convencional, SPD: sistema plantio direto, ILP: integração lavoura-pecuária, PP: pastagem, VN: vegetação nativa

^α Média global da dissimilaridade

^β Influência da densidade de genes

^δ Contribuição % da dissimilaridade entre os sistemas

2.4 Discussão

A densidade de cópias do gene 16S rRNA da comunidade microbiana foi sensível aos sistemas agrícolas. Attard et al., (2011), reportaram as mesmas tendências, com incremento de 15 a 68% em sua abundância para os sistemas integração lavoura-pecuária (ILP) e plantio direto (SPD). Estas alterações podem ser

variáveis, algumas vezes relacionadas com as mudanças nas propriedades do solo, como disponibilidade de água, teores de carbono orgânico total e fósforo total, que podem ter suportado o crescimento das comunidades microbianas. Diversos autores mostraram que o P (fósforo) e fósforo orgânico tem incrementado a densidade de células, além disso, tem sido documentado como principal nutriente condicionador da comunidade microbiana (PELTZER et al., 2010; JANGID et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; BARBOSA LIMA et al., 2014), assim como os baixos níveis de P (SU et al., 2015).

Neste estudo, verificamos que o número de cópias de archaea e a riqueza de bactéria, baseado nas TRFs, foram positivamente ($p < 0.05$) associadas com P. Interessantemente, o número de cópias de archaea e a riqueza de Bacteria foram negativamente correlacionados com carbono e nitrogênio. Fierer et al. (2012), relataram que altos conteúdos de N em solos agrícolas apresentaram alta reação inibitória da atividade microbiana. Salton et al. (2014) demonstrou que o conteúdo de P pode ter contribuído para o aumento da atividade microbiana e índices de qualidade de manejo solo. Para tanto, Peltzer et al. (2010) relataram que independente dos níveis de nitrogênio e carbono, o crescimento da comunidade microbiana pode ser altamente afetado pelo conteúdo de P no solo. Interessantemente, a maior abundância e estrutura microbiana encontrada nos sistemas SC, SPD e ILP podem ter ocorrido a expensas do conteúdo de P (Figura 2), assim como reportado por Geisseler e Scow (2014) e SU et al. (2015).

As melhores condições ambientais em PP podem ser sustentadas pela excreta de animais depositados no solo, disponibilizando rapidamente fontes de N, C e P, nos sistemas em solos com pastejo. Além de a própria planta ter favorecido a liberação de exsudados que podem resultar em melhor alfa-diversidade e riqueza microbiana neste ambiente que em ambientes naturais (RODRIGUES et al., 2013). Adicionalmente, Macdonald et al. (2014) estudaram um sistema de longo período, e mostraram que a pastagem tipicamente suporta uma larga diversidade e atividade da comunidade microbiana, resultando em alta entrada de C, devido a microbiota estar intimamente conectada através de numerosas interações, que são importantes fatores que governam as funções ambientais do ecossistema. Lee e Schmidt (2014) mostraram resultados similares, pois verificaram que os níveis de P podem ser rapidamente mineralizados durante certo tempo, e que em alguns sistemas a entrada de fósforo pode ser menor que o sistema necessita para manutenção da

comunidade microbiana. Assim, os níveis de P hora em excesso em alguns sistemas (SPD), hora menores em outros (PP e SC) podem ter contribuído na diferenciação da estrutura da comunidade microbiana do solo (GEISSELER; SCOW, 2014).

As diferentes taxas de distúrbio indicaram que os sistemas podem selecionar entre organismos generalistas (r) e estrategistas (k). Figuerola et al. (2014) também reportaram que as populações de generalistas diminuíram no ambiente natural. Adicionalmente, estes autores sugerem que sistemas mal manejados podem aumentar significativamente o número destes indivíduos (r) que em práticas de manejo conservacionistas e ambientes naturais, mostram baixa taxa de organismos endêmicos.

Resultados similares obtidos por Cederlund et al. (2014), foram encontrados nesse estudo, onde a maior abundância do filo *Actinobacteria* relacionado com a resistência a eventos, que possam perturbar a comunidade e *Verrucomicrobia* envolvida na decomposição de nutrientes recalcitrantes, nos sistemas SPD e ILP no período de verão, nestes ambientes, sofrerão adição fertilizantes, que podem ter largo efeito nos ciclos biogeoquímicos (CEDERLUND et al., 2014). O aumento da abundância de *Firmicutes* no SC, o qual está relacionado a ambientes mais extremos, pode ser explicado pelas constantes arações e gradagens sob este sistema, tornando o sistema mais estressado e propício à degradação (LAUBER et al., 2013).

Em nosso estudo, verificamos que SPD e ILP contribuíram significativamente, quanto às diferentes abundâncias de cópias do gene de grupos nitrificantes no solo. Estudos prévios têm relatado que os organismos nitrificantes podem ocupar amplos e diversos ecossistemas terrestres (JIA e CONRAD, 2009). Talvez o fator que pode ter contribuído diretamente com maior número de cópias encontrados nos grupos de Bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e Archaeas oxidadoras de amônia (AOA), sejam os poros preenchidos por água (WFPS) (GLEESON et al., 2010). Outro fator com significativa contribuição no incremento do número de cópias foram os valores de pH menores que 5,5, os quais possivelmente incrementaram a densidade de cópias no solo (PROSSER; NICOL, 2012; RACHID et al., 2013) e o uso de fertilizantes (SU et al., 2015).

A transição do sistema convencional para sistemas com maior complexidade (SPD e ILP), ocorre em uma progressão na abundância de cópias da comunidade nitrificante, demonstrando que neste tipo de sistema essas comunidades podem ser

favorecidas (WESSEN et al., 2010b). O incremento de cópias dos genes AOA e AOB foi induzido pelo decréscimo nos níveis de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-). Estudos já haviam reportados este efeito em função dos baixos níveis de amônio (LEVICNIK-HOFFERLE et al., 2012; PARANYCHIANAKIS et al., 2013). A correlação do número de cópias de ambos grupos AOB ($r^2 = 0.74$, $p < 0.0001$, Spearman's) e AOA ($r^2 = 0.75$, $p < 0.0001$, Spearman's) com *nosZ* (ERGUDER et al., 2009), que podem sugerir, que a complexidade os sistemas, podem proporcionar maiores conversão de NO_3^- para N_2 (PETERSEN et al., 2012; BODELIER; STEENBERGH, 2014). Adicionalmente, o grupo contendo o gene *amoA* tem sido correlacionada com a atividade nitrificante dos solos (FIERER et al., 2005, FRANCIS et al., 2005, JIA; CONRAD, 2009, PARANYCHIANAKIS et al., 2013), esses resultados aumentam a capacidade de grupos contendo os genes AOA e AOB, como indicador funcionalmente da oxidação de amônio no solo.

Ambas as densidades de redutores de amônio foram reduzidas no período de inverno acompanhado pelo acréscimo de NH_4^+ e NO_3^- principalmente em SPD e PP. Tal efeito sazonal ainda não foi encontrado na literatura para número de cópias dos genes associados à redução de amônia, mas verificamos que a abundância de cópias dos genes AOB, AOA e *nirS* e *cnorB* foram reduzidas no inverno, mas já é conhecido que muitos organismos têm suas funções reduzidas em relação ao menor regime de chuvas. Interessantemente, no período de inverno a precipitação foi 200% menor que a precipitação verificada para o verão. Esse resultado, pode ter afetado as comunidades responsivas pela ciclagem de nitrogênio no solo (PHILIPPOT et al., 2013).

A magnitude da abundância de cópias dos genes *nirK* e *nirS* comportaram-se de forma diferente nos solos, devido a diferentes manejos e épocas de amostragem. Os resultados estão de acordo com estudos prévios de Attard et al. (2011), que resultaram em alta abundância de cópias do gene *nirK* e *nirS* no SPD, também verificamos maior densidade de cópias dos genes *nirK* e *nirS* em ILP que no PP. Parece que estes sistemas apresentam alto potencial em aumentar os processos de desnitrificação no solo, mas estes resultados não implicam em maior emissão de N_2O , para este estudo. Salton et al. (2014), avaliaram todo ciclo da cultura soja em 2011 e mostraram maior emissão de N_2O no SC. No ano seguinte foi mensurado as emissões dos gases em laboratório durante oito semanas para confirmação dos resultados mostrando que as maiores emissões de N_2O foram obtidas no sistema

convencional.

Outro fator que pode ter contribuído com a variação funcional entre sistemas de cultura foi a qualidade dos resíduos culturais, a qual foi diferente no período de inverno, com teores de carbono orgânico e constantes aplicações de fertilizantes em SC e SPD, a mesma adição foi feita em ILP e PP, exceto no período de 2 anos quando ILP esta sendo usado como pastagem, isso podem ter afetado a estrutura da comunidade microbiana e sua função. Liang et al. (2015) avaliaram um experimento com mais de 150 anos com aplicação de fertilizantes, e verificaram que pode ocorrer um desbalanço na comunidade microbiana do solo, aumentando *Alfa*, *Beta* e *Gammaproteobacteria* e diminuir *Deltaproteobacteria*, mas num contexto geral o uso de fertilizantes pode incrementar os grupos de Bacteria, Archaea, fungos e atividades de várias enzimas no solo.

E finalmente, as altas taxa de *nosZ/nirS* no inverno e *nosZ/nirK* no verão sugerem que a grande proporção de genes *nosZ* pode resultar em maior capacidade tampão dos sistemas SPD, ILP reduzindo o potencial de emissão de N₂O (REGAN et al., 2011; ITAKURA et al., 2012; JONES et al., 2014), e atuar como dreno de N₂O (PHILIPPOT; HALLIN, 2011, JONES et al., 2013, 2014). Considerando que o SPD e ILP tiveram alta taxa de *nosZ*, estes solos podem ter alta capacidade de promover menores taxas de emissão do N₂O.

Mendes et al. (2014) e Lammel et al. (2014), mostram que a rizosfera da soja e os solos cultivados com soja podem selecionar organismos da família *Bradyrhizobiaceae*. Além disso, Itakura et al. (2012) provaram que a redução das emissões, em ecossistemas cultivado com soja, podem ser usado para mitigar as emissões de N₂O pela população de *Bradyrhizobium japonicum*, contendo o gene *nosZ*, e poderiam ser usados como potencial de mitigação de N₂O. Do mesmo modo, as áreas de soja podem ser usadas para mitigação das emissões de N₂O pelo aumento da produtividade e expansão da área de pastagem em sistemas ILP. Além disso, Ruan et al. (2013) e Carvalho et al. (2014), mostraram que os SPD e ILP podem ter forte contribuição no controle das emissões de N₂O.

Juntas, Embrapa e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento recomendam ILP e SPD como sistemas alternativos a SC. A adoção destes sistemas pode resultar em maior aporte de sustentabilidade agrícola (Carvalho et al., 2014). E o conjunto de dados obtidos neste estudo, mostram que a estrutura microbiana e a densidade de genes funcionais podem potencialmente mitigar as

emissões de N₂O em ILP.

2.5 Considerações Finais

A abundância de archaea sofreu drástica redução nos solos de pastagem permanente, resultando em menor densidade funcional de archaeas nitrificantes. Os sistemas com maior complexidade poderiam indicar melhores condições e estabilidade, regulando e moldando os grupos microbianas e suas abundâncias. O sistema integração lavoura-pecuária mostrou promissor potencial em minimizar as emissões de N₂O do solo e significativos efeitos na estrutura das comunidades microbianas do solo.

Referências

ARAÚJO, A.S.F.; BORGES, C.D.; TSAI, S.M.; CESARZ, S.; EISENHAEUER, N. Soil bacterial diversity in degraded and restored lands of Northeast Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 106, n. 5, p. 891–899, 2014.

ATTARD, E.; RECOUS, S.; CHABBI, A.; DE BERRANGER, C.; GUILLAUMAUD, N.; LABREUCHE, J.; PHILIPPOT, L.; SCHMID, B.; le ROUX, X. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, p. 1975–1989, 2011.

BARBOSA LIMA, A.; CANNAVAN, F.S.; NAVARRETE, A.A.; TEIXEIRA, W.G.; KURAMAE, E.E.; TSAI, S.M. Amazonian dark earth and plant species from the Amazon Region contribute to shape rhizosphere bacterial communities. **Microbial Ecology**, Minnesota, v. 69, p. 855–866, 2014.

BARRETO, R.C.; MADARI, B.E.; MADDOCK, J.E.L.; MACHADO, P.L.O.A.; TORRES, E.; FRANCHINI, J.; COSTA, A.R. The impact of soil management on aggregation, carbon stabilization and carbon loss as CO₂ in the surface layer of a Rhodic Ferralsol in Southern Brazil. **Agriculture Ecosystems and Environmental**, Amsterdam, v. 132, p. 243–251, 2009.

BARRETTO, A.G.O.P.; BERNDDES, G.; SPAROVEK, G.; WIRSENIUS, S. Agricultural intensification in Brazil and its effects on land-use patterns: an analysis of the 1975–2006 period. **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, p. 1804–1815, 2013.

BODELIER, P.L.E.; STEENBERGH, A.K. Interactions between methane and the nitrogen cycle in light of climate change. **Current Opinion Environmental Sustainability**, Maryland Heights, v. 9/10, p. 26–36, 2014.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma**

economia de baixa emissão de carbono na agricultura: plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono). Brasília, 2012. 173 p.

CARVALHO, J.L.N.; RAUCCI, G.S.; FRAZÃO, L.A.; CERRI, C.E.P.; BERNOUX, M.; CERRI, C.C. Crop-pasture rotation: a strategy to reduce soil greenhouse gas emissions in the Brazilian Cerrado. **Agriculture Ecosystems and Environmental**, Amsterdam, v. 183, p. 167–175, 2014.

CEDERLUND, H.; WESSÉN, E.; ENWALL, K.; JONES, C.M.; JUHANSON, J.; PELL, M.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 84, p. 62–68, 2014.

DANDIE, C.E.; BURTON, D.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T.; GOYER, C. Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart v. 30, n. 2, p. 128–138, 2007.

ERGUDER, T.H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 855–69, 2009.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA. 2015. Disponível em: <<http://www.febrapdp.org.br>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

FIERER, N.; LAUBER, C.L.; RAMIREZ, L.S.; ZENEVELD, J.; BRADFORD, M.A.; KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, London, v. 6, p. 1007–1017, 2012.

FIGUEROLA, E.L.M.; GUERRERO, L.D.; TÜRKOWSKY, D.; WALL, L.G.; ERIJMAN, L. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 678–688, 2014.

FIGUEROLA, E.L.M.; GUERRERO, L.D.; ROSA, S.M.; SIMONETTI, L.; DUVAL M.E.; GALANTINI, J.A.; BEDANO, J.C.; WALL, L.G.; ERIJMAN, L. Bacterial indicator of agricultural management for soil under no-till crop production. **PloS One**, São Francisco, v. 7, p. e51075, 2012.

GEISSELER, D.; SCOW, K.M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 54–63, 2014.

GLEESON, D.B.; MÜLLER, C.; BANERJEE, S.; MA, W.; SICILIANO, S.D.; MURPHY, D.V. Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1888–1891, 2010.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. **Palaeontology Electronica**, Copenhagen, v. 4, p. 1–9, 2001.

HENRY, S.; BRU, D.; STRES, B.; HALLET, S.; PHILIPPOT, L. 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5181–5189, 2006.

HOPKINS, F.M.; FILLEY, T.R.; GLEIXNER, G.; LANGE, M.; TOP, S.M.; TRUMBORE, S.E. Increased belowground carbon inputs and warming promote loss of soil organic carbon through complementary microbial responses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 76, p. 57–69, 2014.

ITAKURA, M.; UCHIDA, Y.; AKIYAMA, H.; HOSHINO, Y. T.; SHIMOMURA, Y.; MORINOTO, S.; TAGO, K.; WANG, Y.; HAYAKAWA, C.; UETAKE, Y.; SÁNCHEZ, C.; EDA, S.; HAYATSU, M.; MINAMISAWA, K. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by Bradyrhizobium japonicum inoculation. **Nature Climate Change**, London, v. 3, p. 208–212, 2012.

JANGID, K.; WHITMAN, W.B.; CONDRON, L.M.; TURNER, B.L.; WILLIAMS, M.A. Soil bacterial community succession during long-term ecosystem development. **Molecular Ecology**, New York, v. 22, p. 3415–3424, 2013.

JIA, Z.; CONRAD, R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 1658–1671, 2009.

JONES, C.M.; SPOR, A.; BRENNAN, F.P.; BREUIL, M.C.; BRU, D.; LEMANCEAU, P.; GRIFFITHS, B.; HALLIN, S.; PHILIPPOT, L. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 801–805, 2014.

JOST, L. The relation between evenness and diversity. **Diversity**, Oxford, v. 2, p. 207–232, 2010.

KEARNS, P.J.; ANGELL III, J.H.; FEINMAN, S.G.; BOWEN, J.L. Long-term nutrient addition differentially alters community composition and diversity of genes that control nitrous oxide flux from salt marsh sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 154, p. 39–47, 2015.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2nd ed. Madison: ASA; SSSA, 1982. pt. 2: p. 643–698. (Agronomy Monograph, 9);

LAMMEL, D.R.; NÜSSLEIN, K.; TSAI, S.M.; CERRI, C.C. Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and Cerrado (Brazilian Savannah) biomes in Southern Amazonia. **European Journal of Soil Biology**. Paris, v. 66, p. 32–39, 2015.

LANGE, M.; EUSENHAUER, N.; SIERRA, C.A.; BESSLER, H.; ENGELS, C.; GRIFFITHS, R.I.; MELLADO-VÁZQUEZ, P.G.; MALIK, A.A.; ROY, J.; SCHEU, S.; STEINBEISS, S.; THOMSON, B.C.; TRUMBORE, S.E.; GLEIXNER, G. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature Communication**, London, v. 6, p. 6707, 2015.

LAPOLA, D.M.; MARTINELLI, L.A.; PERES, C.A.; OMETTO, J.P.H.B.; FERREIRA, M.E.; NOBRE, C.A.; AGUIAR, A.P.D.; BUSTAMANTE, M.M. C.; CARDOSO, M.F.; COSTA, M.H.; JOLY, C.A.; LEITE, C.C.; MOUTINHO, P.; SAMPAIO, G.; STRASSBURG, B.B.N.; VIEIRA, I.C.G. Pervasive transition of the Brazilian land-use system. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 27–35, 2013.

LAUBER, C.I.; RAMIREZ K.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal**, London, v. 7, p. 1641-1650, 2013.

LEE, Z.M.; SCHMIDT, T.M. Bacterial growth efficiency varies in soils under different land management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 69, p. 282–290, 2014.

LEHTOVIRTA, L.E.; PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 70, p. 367–376, 2009.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWAK, L.; QI, L.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806–809, 2006.

LEVY-BOOTH, D.J.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochem**, Oxford, v. 75, p. 11–25, 2014.

LIANG, Y.; WU, L.; CLARK, I.M.; XUE, K.; YANG, Y.; VAN NOSTRAND, J.D.; DENG, Y.; HE, Z.; McGRATH, S.; STORKEY, J.; HIRSCH, P.R.; SUN, B.; ZHOU, J. Over 150 Years of Long-Term Fertilization Alters Spatial Scaling of Microbial Biodiversity, **mBio**, Washington, v. 6, n. 2, p. e00240-15.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2333-2333, Jun 1998.

MARTINELLI, L.A. **Ecosystem services and agricultural production in Latin America and Caribbean**. Buenos Aires: Inter-American Development Bank, 2012. 16 p. (Technical Notes, IDB-TN-382).

MACDONALD, C.A.; CRAWLEY, M.J.; WRIGHT, D.J.; KUCZYNSKI, J.; ROBINSON, L.; KNIGHT, R.; AL-SOUD, W. A.; SØRENSEN, S.J.; DENG, Y.; ZHOU, J.; SINGH, B.K. Identifying qualitative effects of different grazing types on below-ground

communities and function in a long-term field experiment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 841–854, 2014.

MENDES, L.W.; KURAMAE, E.E.; NAVARRETE, A.A.; van VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, London, v. 8, p. 1577–1587, 2014.

McCUNE, B.; GRACE, J.B. **Analysis of ecological communities**. Edinburgh: MjM Software Design, 2002. 284 p.

MORALES, S.E.; COSART, T.; HOLBEN, W.E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 799–808, 2010.

PARANYCHIANAKIS, N.V.; TSIKNIA, M.; GIANNAKIS, G.; NIKOLAIDIS, N.P.; KALOGERAKIS, N. Nitrogen cycling and relationships between ammonia oxidizers and denitrifiers in a clay-loam soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 5507–5515, 2013.

PELTZER, D.A.; WARDLE, D.A.; ALLISON, V. J.; BAISDEN, W.T.; BARDGETT, R.D.; CHADWICK, O.A.; CONDRON, L.M.; PARFITT, R.L.; PORDER, S.; RICHARDSON, S. J.; TUNER, B.L.; VITOUSEK, P.M.; WALKER, J.; WALKER, L.R. Understanding ecosystem retrogression. **Ecology Monographs**, New York, v. 80, p. 509–529, 2010.

PETERSEN, D.G.; BLAZEWCZ, S.J.; FIRESTONE, M.; HERMAN, D.J.; TURETSKY, M.; WALDROP, M. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 993–1008, 2012.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 16, p. 476–480, 2011.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SCHLOTTER, M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. **Advances in Agronomy**, New York, v. 96, p. 249–305, 2007.

PHILIPPOT, L.; SPOR, A.; HÉNAULT, C.; BRU, D.; BIZOUARD, F.; JONES, C.M.; SARR, A.; MARON P.A. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. **The ISME Journal**, London, v. 7, p. 1609–1619, 2013.

PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. **Trends Microbiology**, Cambridge, v. 20, p. 523–31, 2012.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142–160, 2007.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, G.M.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial

integrated and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 66, p. 146–153, 2013.

REEVE, J.R.; SCHADT, C.W.; CARPENTER-BOGGS, L.; KANG, S.; ZHOU, J.; REGANOLD, J.P. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 1099–1107, 2010.

REGAN, K.; KAMMANN, C.; HARTUNG, K.; LENHART, K.; MULLER, C.; PHILIPPOT, L.; KANDELER, E.; MARHAN, S. Can differences in microbial abundances help explain enhanced N₂O emissions in a permanent grassland under elevated atmospheric CO₂? **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, p. 3176–3186, 2011.

RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, .C.; PAULA, F.S.; MIRZA, B.; HAMAOU, G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJEG, J.M.; BOHANNAN, B.J.; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 988–993, 2013.

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

RUAN, L.; ROBERTSON, G.P. Initial nitrous oxide, carbon dioxide, and methane costs of converting conservation reserve program grassland to row crops under no-till vs. conventional tillage. **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, p. 2478–2489, 2013.

SALTON, J.C.; MERCANTE, F.M.; TOMAZI, M.; ZANATTA, J.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, W.M.; RETORE, M. Integrated crop-livestock system in tropical Brazil: Toward a sustainable production system. **Agricultural Ecosystem and Environmental**, Amsterdam, v. 190, p. 70–79, 2014.

SINGH, B.K.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J.M.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Agronomy**, Montrouge Cedex, v. 57, p. 72–82, 2006.

STONE, M.M.; KAN, J.; PLANTE, A.F. 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**, Oxford, v. 80, p. 273–282, 2015.

SU, J.K.; DING, L.J.; XUE, K.; Yao, H.Y.; QUENSEN, J.; BAI, S.J.; WEI, W.X.; WU, J.S.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M.; ZHU, Y.G. Long-term balance fertilization increase the soil microbial functional diversity in a phosphorous-limited paddy soil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 24, n. 1, p.136–150. 2015.

SULC, R.M.; FRANZLUEBBERS, A.J. Exploring integrated crop–livestock systems in different ecoregions of the United States. **European journal of agronomy**, Montrouge Cedex, v. 57, p. 21–30, 2014.

THEIS, K.R.; SCHMIDT, T.M.; HOLEKAMP, K.E. Evidence for a bacterial mechanism for group-specific social odors among hyenas. **Scientific Reports**, London, v. 2, p. 615, 2015.

van RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2001. 284 p.

WESSÉN, E.; NYBERG, K.; JANSSON, J.K.; HALLIN, S. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 193–200, 2010.

YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, New Yorq, v. 89, p. 670-679, 2005.

3 AUMENTO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE CO₂ ALTERA A ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E AS EMISSÕES DE N₂O

Resumo

Embora seja pouco provável que o aumento na concentração atmosférica de CO₂ tenha efeitos diretos sobre as comunidades microbianas do solo, o incremento deste gás junto com o aumento da temperatura pode afetar indiretamente os ecossistemas do solo, por meio de respostas das plantas. Este estudo avaliou a hipótese de que a exposição de plantas a concentrações elevadas de CO₂ atmosférico e aumento da temperatura, impacta a microbiota do solo, responsáveis por processos-chave na ciclagem do nitrogênio. As amostras de ar foram coletadas em câmaras estáticas e mensuradas por cromatografia gasosa para os gases do efeito estufa CO₂, N₂O e CH₄. O solo foi amostrado na profundidade de 0-10 cm, sendo posteriormente encaminhados para análises moleculares, químicas e físicas. O PCR em tempo real foi usado para quantificar os genes funcionais, e o sequenciamento, pela plataforma Illumina (MiSeq), para acessar a composição da comunidade microbiana e funcional do solo. O experimento controlado foi conduzido no campo experimental da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto/SP. As plantas *Stylosanthes capitata* Vogel e *Panicum maximum* L. subg. foram crescidas em consórcio, no sistema T-FACE (*temperature free-air controlled enhancement* e *carbon dioxide free-air enrichment*), mantidas em concentração ambiente (CO₂ e temperatura) e elevada (CO₂ 600 ppm e temperatura +2°C que a ambiente), sendo distribuídos nos seguintes tratamentos: i) controle (C), com temperatura e concentração de CO₂ ambiente; ii) elevado CO₂ (eC), com concentração de CO₂ a 600 ppm e temperatura ambiente; iii) elevada temperatura (eT), com a temperatura elevada em +2°C e CO₂ ambiente; iv) e a combinação entre os tratamentos de elevada temperatura e elevado CO₂ (eT+eC). Os resultados mostraram que as emissões de CO₂ foram potencialmente reduzidas ao longo do experimento. As emissões de N₂O parece ter sido potencialmente controlado pela abundância do gene *nosZ*. As maiores respostas das emissões de N₂O ocorreram após à adição de uréia, por cobertura, com incremento ($p < 0.001$) de 3 a 4 vezes nas emissões nos tratamentos com elevada temperatura (eT) e na combinação de elevada temperatura e concentração de CO₂ (eT+eC), respectivamente. O potencial de aquecimento global foi incrementado com o aumento da temperatura em 37% (eT) a 41% para eT+eC. De acordo com os dados obtidos, o grupo taxonômico *Alphaproteobacteria* parece ter sido o maior responsável por estas emissões, enquanto que *Deltaproteobacteria* pode controlar as emissões de N₂O. Os conjuntos dos dados mostrou claros efeitos da contribuição de alguns grupos taxonômicos no controle das emissões de N₂O, e a elevada temperatura pode incrementar o potencial de aquecimento global como consequência de maiores emissões dos gases de efeito estufa.

Palavras-chave: Emissões de gases do efeito estufa; Mudanças climáticas; Potencial de aquecimento global; Ecologia microbiana; Marcadores funcionais; Metanotróficas; AOA; AOB; *nosZ*; *pmoA*

Abstract

Although it is unlikely that the increase in atmospheric CO₂ concentration has a direct effect on the soil microbial communities, the increase of this gas with warming can affect the soil ecosystems indirectly through the plant responses. This study tested the hypothesis that exposure of plants to high concentrations of atmospheric CO₂ and warming impacts on the soil microbes responsible for the key processes in nitrogen cycling. Air samples were collected in static chambers and measured by gas chromatography for the greenhouse gases CO₂, CH₄ and N₂O, and soil samples in the depth of 0-10 cm were sampled for molecular, chemical and physical analysis. Real-time PCR was used to quantify the functional genes and sequencing the Illumina platform (MiSeq) to access the functional composition of the microbial community of soil through metagenomes. The experiment was conducted at the Trop-T-FACE system (free-air temperature controlled enhancement and carbon dioxide free-air enrichment) installed in the experimental field of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Stylosanthes capitata* Vogel and *Panicum maximum* Jacq. grown in consortium were exposed to conditions of elevated temperature and CO₂ distributed in the following treatments: control (C) with temperature and ambient atmospheric CO₂ concentration, elevated CO₂ (eC) with CO₂ concentration up to 600 ppm and ambient temperature, elevated temperature (eT) with high temperature + 2 ° C and CO₂ environment and the combination of high temperature and high CO₂ treatments (eT + eC). CO₂ emissions were potentially reduced during the experiment, which seems to be potentially controlled by the abundance of *nosZ* gene. In response to the addition of urea, N₂O emission increase ($p < 0.001$) up to 3 to 4 times in plots under high temperature (eT) and combination of high temperature and CO₂ concentration (eT + eC), respectively. The global warming potential was increased by 37 to 41%. According to the data the taxonomic group *Alphaproteobacteria* seems to have been largely responsible for these emissions, while *Deltaproteobacteria* can control the emissions of N₂O. The sets of data clearly show that the contribution of some taxonomic groups can control the emissions of N₂O and the high temperature may increase the global warming potential as a result of higher emissions of greenhouse gases.

Keywords: Emissions of greenhouse gases; Climate changes; Global warming potential; Microbial Ecology; Functional markers; Methanotrophic; AOA; AOB; *nosZ*; *pmoA*

3.1 Introdução

Recentemente, o Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014), divulgou no seu 5º relatório, que a contribuição do setor da agrícola é de 24% nas emissões dos gases do efeito estufa para atmosfera. Neste contexto, as concentrações de metano (CH₄) aumentaram de 715 para 1774 ppb, e óxido nitroso (N₂O) de 270 para 319 ppb, levando a um incremento de 0.8 ppb ao ano (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013). A concentração atmosférica dos gases CH₄ e N₂O é menor que a de CO₂, mas com maior potencial de aquecimento global, de 30 e 300, respectivamente (REAY et al., 2012), estes gases contribuem com

aproximadamente 14% e 6%, respectivamente, para o aquecimento global (MONTZKA et al., 2011; RAVISHANKARA et al., 2009). No atual ano de 2014, registrou-se um aumento na temperatura do ar de 0.7°C, para tanto, existem predição que o aumento da concentração dos gases do efeito estufa na atmosfera, serão de 2.6 a 4,8°C até o ano de 2100 (IPCC, 2014). Atualmente, o ecossistema terrestre são responsáveis por aproximadamente 70% do total de N₂O atmosférico, dos quais pelo menos 45% do pode ser atribuído a ciclagem de nitrogênio na agricultura (SYAKILA; KROEZE, 2011).

O aumento da temperatura e concentração de carbono podem afetar indiretamente algumas comunidades microbianas do solo e suas funções, consequentemente, a ciclagem de nutrientes (XIONG et al., 2015). Assim, o aquecimento da temperatura pode acelerar a respiração microbiana do solo devido o aumento na atividade enzimática (NIE et al., 2013), podendo promover maior produção de N₂O, pois o processo de desnitrificação é resultado da respiração microbiana, que é responsável por retornar o N fixado para atmosfera. Esse processo é favorecido em altas condições de umidade, com níveis restritos de oxigênio e disponibilidade de NO₃⁻ e carbono orgânico (LUO et al., 2010).

Apesar de os solos agrícolas apresentarem, em geral, boa drenagem, podem ocorrer micro-sítios no interior dos agregados, com baixa disponibilidade de oxigênio e condições favoráveis à desnitrificação (CARTER, 2007). Surpreendentemente, pouco se sabe sobre o comportamento das enzimas, reguladoras e redutoras de N₂O. Estas enzimas têm sido estudadas pela abundância do gene *nosZ* (MERGEL et al., 2001). Segundo Morales et al. (2010), a comunidade microbiana do solo é capaz de regular as emissões de N₂O naturalmente, podendo atuar como fonte ou dreno de N₂O.

Para tanto, compreender as respostas da comunidade microbiana do solo frente ao aumento da concentração de CO₂ (eC) e temperatura (eT) são de extrema importância para predizer a contribuição dos ecossistemas terrestres em relação ao futuro das mudanças climáticas. A abundância dos genes funcionais (*nirS/K* e *nosZ*) tem sido importante e útil para predizer a ciclagem de nitrogênio (PETERSEN et al., 2012). Assim, como as mudanças na diversidade microbiana (PHILIPPOT et al., 2013). Stone e colaboradores (2015) ressaltam que os processos metabólicos do solo refletem nos genes funcionais, e que o declínio da abundância de um gene funcional pode estar associado à diminuição da atividade metabólica no ambiente.

Porém, há poucos estudos que avaliam a abundância da comunidade desnitrificante em solos com aumento de temperatura e concentração de CO₂ em pastagens Tropicais. No Brasil esse foi primeiro experimento conduzido em consórcio de plantas C₃ e C₄ em sistema T-FACE (*temperature free-air controlled enhancement e carbon dioxide free-air enrichment*).

Desta forma, foi avaliada a hipótese que a elevada concentração de CO₂ e temperatura pode alterar a composição microbiana e o potencial funcional de microrganismos associados as emissões de gases do efeito estufa em solos cultivados com plantas C₃ e C₄. Neste contexto, objetivou-se monitorar as respostas da comunidade microbiana e seu potencial funcional, e o fluxo de gases do efeito estufa CO₂, CH₄ e N₂O. Em um segundo estudo, determinamos o efeito da fertilização nitrogenada (uréia) em relação ao potencial funcional dos microrganismos do solo e a produção de N₂O.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Caracterização do Sistema Trop-T-FACE e tratamentos

O experimento foi conduzido entre os meses de abril a julho no sistema Trop-T-FACE, instalado no campus da Universidade de São Paulo (USP), na cidade de Ribeirão Preto-Brasil, latitude 21°10'7.95"S e longitude 47°51'49.62"O, com elevação de 574 m do nível do mar. As plantas forrageiras, *Stylosanthes capitata* Vogel (planta de metabolismo fotossintético C3) e *Panicum maximum* Jacq. (planta de metabolismo fotossintético C4), foram crescidas em consorcio sob os seguintes tratamentos: i) controle (C), com temperatura e concentração de CO₂ ambiente; ii) elevado CO₂ (eC), onde a concentração de CO₂ foi elevada a 600 ppm; iii) elevada temperatura (eT), na qual a temperatura foi elevada em +2°C em relação à temperatura ambiente; iv) e a combinação entre os tratamentos elevada temperatura (+2°C) e elevada concentração de CO₂ (600 ppm)(eT+eC). Para as plantas forrageiras, a adubação e densidade das plantas foram seguidas de acordo com as recomendações da Embrapa (2007).

Os tratamentos foram conduzidos em parcelas com 2 m de diâmetro e 4 repetições, em blocos completamente randomizados. A concentração de CO₂ no controle variou de 349 (diurno) a 539 ppm (noturno), enquanto que as parcelas com elevada concentração de CO₂ foram mantidas com 600±50 ppm, por meio de fumigação de CO₂ puro durante o período diurno. O aquecimento das parcelas foi

mantido durante os períodos diurno e noturno com aquecedores de cerâmica modelo FTE 750-240 (*Mor Electric Heating Association*, Comstock Park, MI, USA), em arranjos hexagonais e colocados acima do dossel das plantas (Kimball et al, 2008). A temperatura das parcelas aquecidas foi controlada com *dimmers* (Kalglo Electronics, Bethlehem, PA, USA) para que o ajuste da voltagem dos aquecedores fosse automático. O monitoramento da temperatura das parcelas foi realizado por meio de radiômetros infravermelhos, modelo SI-1H1 (Apogee Instruments, Logan, UT, USA). Todo o controle e registro de dados foi realizado em datalogger (modelo CR1000), equipado com módulos SDM-CV04 *current-voltage output module*, multiplexadores AM 16/32 *channel relay multiplexer*, e uma unidade NL200 *Ethernet communication unit* para o envio de dados ao computador via rede. Todos os componentes do controle foram adquiridos pelo fabricante Campbell Scientific (Logan, UT, USA). A aplicação dos tratamentos foi realizada no estágio vegetativo das plantas. A fertilização do solo para o plantio das sementes das duas espécies, descritas anteriormente, foram feitas com base na análise química e de acordo com as recomendações do boletim 100, específica para o estado de São Paulo. Adicionalmente, duas aplicações de uréia 60 kg de N, por cobertura, foram realizadas em duas épocas, primeira fertilização ocorreu no dia 08 e segunda no dia 42, após o corte de uniformização das plantas, simulando o pastoreio dos animais.

Figura 3.1 - Médias das temperaturas atmosférica e do solo determinadas nas parcelas Trop-T-FACE durante os 83 dias de experimento, em 2014. Controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada T°C (eT), elevada T°C+CO₂ (eT+eC), n = 4

3.2.2 Amostragem do solo

As amostras foram coletadas na profundidade de 0-0,10 m de profundidade nas parcelas do Trop-T-FACE (*temperature free-air controlled enhancement e carbon dioxide free-air enrichment*). nos tempos 0, dois dias antes da aplicação dos tratamentos de elevada temperatura e elevada concentração de CO₂, e após a instalação do experimento semanalmente criando uma soloteca. Ao final do experimento com base nas informações de das emissões de óxido nitroso (N₂O) foram selecionados cinco tempos (0, 6, 20, 55 e 76 dias) para as determinações do potencial funcional do solo acessados por técnicas moleculares. E no último dia (83 dia) foram amostrados solos como descrito anteriormente e o solo rizosférico. As condições média de temperatura média de cada tratamento durante o experimento podem ser encontradas na Figura 3.1, e a composição química após 20 dias da instalação do experimento na Tabela 3.1.

Para a amostragem do solo da rizosfera, foram retiradas duas plantas (*Panicum maximum*) por parcela no último dia de experimento, (83 dias). As plantas foram agitadas manualmente para que todo solo não aderido as raízes se desprendesse. O solo rizosférico foi considerado somente o solo que permaneceu

aderido as raízes. Já em laboratório foram separados os solos das raízes de *Panicum maximum*. O solo rizosférico foi congelado em -20 °C até o momento da extração do DNA do solo.

As análises químicas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Raij et al. (2001).

3.2.3 Determinação dos poros preenchidos por água

A umidade do solo foi determinada por sensores e os dados armazenados em datalogger. A densidade do solo, os macro, microporos, e os poros totais do solo foram mensurados em cada parcela por anéis volumétricos, de aço de 230 cm³, no sexto dia após a instalação do experimento. Os teores de oxigênio e água disponível nos poros do solo foram determinados, e assim foi definido a relação total de poros preenchidos por água no solo, expresso em % de acordo com Attard et al. (2011).

Poros preenchidos por água= (densidade do solo x conteúdo gravimétrico de água)/ porosidade. Porosidade= (densidade / densidade da partícula do solo). O valor da densidade de partícula foi determinada em laboratório e padronizada em 2,65 g cm³.

Tabela 3.1 - Propriedades químicas do solo no Trop-T-FACE na camada 0 a 10 cm de profundidade, em Ribeirão Preto, SP

Atributos do solo	C	eC	eT	eT+eC
pH	5,75 ^a ±0,10	5,45 ±0,12	5,10 ±0,10	5,90 ±0,18
P (mg.dm ⁻³)	27,25 ±8,08	31,75 ±12,63	75,50 ±6,89	70,25 ±4,71
K (mmolc.dm ⁻³)	1,60 ±0,27	1,75 ±0,31	1,55 ±0,34	1,68 ±0,13
Ca (mmolc.dm ⁻³)	42,50 ±3,07	32,75 ±9,99	34,25 ±1,93	39,25 ±2,14
Mg (mmolc.dm ⁻³)	14,00 ±1,78	10,50 ±1,19	9,50 ±1,04	12,50 ±0,50
H+Cl (mmolc.dm ⁻³)	32,50 ±0,87	36,00 ±2,00	40,00 ±2,00	28,00 ±0,00
SB (mmolc.dm ⁻³)	58,10 ±3,23	44,98 ±10,32	45,30 ±2,58	53,43 ±2,36
CTC (mmolc.dm ⁻³)	90,60 ±3,81	81,00 ±8,70	85,30 ±2,48	81,43 ±2,36
V (%)	64,25 ±1,03	53,25 ±7,82	53,25 ±2,29	65,50 ±0,96
COT (g.dm ⁻³)	21,51 ±1,97	20,35 ±0,41	19,77 ±0,86	21,08 ±1,02
N (mg Kg ⁻¹)	1993,2 ±91,55	1440,2 ±125,4	1995,0 ±225,9	1765,7 ±154,8
NH ₄ (mg Kg ⁻¹)	54,00 ±9,19	54,00 ±18,09	9,50 ±0,96	6,00 ±0,71
NO ₃ (mg Kg ⁻¹)	41,00 ±5,76	104,25 ±35,14	26,00 ±2,94	22,50 ±3,30

Controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada T°C (eT), elevada T°C+CO₂ (eT+eC)

P = fósforo, K = potássio, Ca = cálcio, Mg = magnésio, H+Al = acidez potencial, SB = soma de bases, CTC = capacidade de troca catiônica, V = saturação de CTC por bases, COT= carbono orgânico total, N = nitrogênio, NH₄ = amônio e NO₃ = nitrato.

Média ± desvio padrão

^aValores médios n=4.

3.2.4 Avaliação das emissões de gases do efeito estufa

As emissões de gases do efeito estufa do solo foram monitoradas, semanalmente, durante os 83 dias após a instalação do experimento no sistema Trop-T-FACE. O ar foi amostrado usando câmaras estáticas. As bases foram enterradas por 5 cm de profundidade no solo, no momento da coleta eram vedadas com tampas de PVC, as quais continham duas válvulas e uma lamina de água que vedava o ar na parte superior das bases. Com o auxílio de seringas BD, de 20mL, o ar foi amostrado nos tempos de 0, 05, 15 e 30 minutos, manualmente, em câmaras estáticas. Antes da amostragem, o ar que estava dentro das câmaras era homogeneizado. Assim, o ar amostrado era transferido e armazenado em *exetainers vials* (20 mL) em vácuo, e mantidos em temperatura ambiente até o momento da

mensuração dos gases. O ar foi analisado por cromatografia gasosa (SRI-8610C, USA), não mais que 30 horas posterior a amostragem. O aumento da concentração dos gases (CO₂, CH₄ e N₂O) durante o tempo foi checado linearmente, e o fluxo calculado de acordo com Hutchinson and Moiser (1981). O acúmulo dos gases (CO₂, CH₄ e N₂O) foi calculado manualmente para interpolação semanal do fluxo dos gases, usando o método trapezoidal. O valor médio dos gases foram calculados das médias dos valores das 4 parcelas, em cada tratamento.

3.2.5 Extração de DNA genômico e quantificação do gene *nosZ* por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

O DNA genômico foi extraído de 0,30 g de solo em triplicatas, usando PowerSoil PowerLyzer DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e armazenado a -20 °C até o momento de uso. Todos os genes usados foram quantificados pela técnica de PCR quantitativo (qPCR), utilizando StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As reações continham 10 µg/µL, 1 BSA µL, 5,5 µM de cada primer, 10 µL de qPCR SYBR master mix 2x (fermentas) e 10 a 20 ng do DNA e os *primers* (AOA, AOB e *nosZ*) na concentração de 10nM. As amplificações foram realizadas conforme descritos na tabela 2.1, e a especificidade do conjunto de *primers* foi checada pela observação de um único pico de *melting*, confirmando a pureza dos produtos amplificados. Adicionalmente, foram corridos gel de agarose (1%) para confirmação do tamanho dos *amplicons*. O *amplicon* do gene foi obtido de clones de amostras ambientais por PCR usando os *primers* (Tabela 2.1) purificados com Kit GFX e ligados em um vetor pGEM-T (Promega). Os vetores contendo os insertos foram transformados com células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Promega). Para a quantificação e obtenção de uma curva padrão, os insertos clonados foram re-amplificados usando *primers* (Tabela 2.1), onde os clones foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-2000) e diluídos para construir uma curva padrão usando uma diluição seriada de 10² a 10⁷ genes µL⁻¹, e usando triplicatas com diluição seriada de 10 vezes do clone do isolado ambiental. Também foram usados organismos padrão como controle positivo, *Paracoccus denitrificans* (DSM 413) e *Pseudomonas fluorescens* (DSM 6506). O número de cópias dos genes foi

apresentado por grama de solo seco.

3.2.6 Sequenciamento do metagenoma nextera-Illumina

O solo selecionado para o sequenciamento foi o do dia 20, logo após a fertilização de nitrogênio por cobertura. O metagenoma total das 16 amostras foi obtido do material extraído, independentemente das 16 amostras de DNA do solo, sendo utilizado para o sequenciamento do mesmo solo, de cada amostra, e realizados de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi aferido por espectrofotômetro NanoDrop® ND-2000, obtendo-se a quantidade e qualidade ($A_{260/280}$ foi ~ 1.82), e adicionalmente, mensurados fluorometricamente pelo Qubit® 2.0 usando o Kit Qubit® dsDNA BR assay kit (Molecular Probes, Life Technologies™, USA) para confirmar a quantidade de DNA. Foram realizadas as ligações dos DNA Nextera® index kit *primer 1* (i5) e *primer 2* (i7), para obter uma diversidade suficiente e uma definição de cada biblioteca, as quais foram reconhecidas na análise no final do sequenciamento. O preparo das bibliotecas foi realizado com kit Nextera® DNA sample prep. Kit. Posteriormente, o produto da PCR foi purificado com auxílio de uma *magnetic Stand* 96 (Ambion® RNA, Life Technologies™ USA), usando *beads* magnéticas Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter™, Inc., CA, USA). Antes da quantificação, as 16 bibliotecas, independentes, foram juntadas, formando um pool de biblioteca, em concentração equimolar padronizada. O pool de biblioteca foi quantificado com KAPA SYBR®FAST qPCR obtendo-se ao final uma concentração do pool da biblioteca de $2\text{nM } \mu\text{L}^{-1}$. A concentração de 2nM do pool de biblioteca foi desnaturada com NaOH $0,1\text{N}$ para obter uma concentração de 13pM . Ao final, carregou-se $480\mu\text{L}$ de DNA desnaturado e $180\mu\text{L}$ Phix desnaturado no cartucho MiSeq® Nextera® V2 500 ciclos. Um total de 16 bibliotecas foram obtidas do sequenciamento (4 parcelas x 4 tratamentos).

3.2.7 Análise metagenômica

A junção das *reads* foi realizado com o auxílio do programa “Flash”, com posterior limpeza das sequências usando o “SeqyClean”, permanecendo assim somente sequências *single ended*, com qualidade superior a 20 e com comprimento mínimo de 50 pb (pares de base). As sequências foram *uploaded* para o (MG-RAST)

(MEYER et al., 2008). Para anotação metagenômica foi usado *default settings* e o número de acesso, ainda não disponível, 4566889.3, 4566890.3, 4571578.3, 4566893.3, 4571576.3, 4571577.3, 4576060.3, 4576061.3, 4571580.3, 4571579.3, 4576062.3, 4571574.3, 4567554.3, 4577142.3, 4567552.3, 4567551.3 (Tabela 3.2). As tabelas de frequência taxonômica presentes aqui resultaram da *best hit classification* contra o banco de dados M5NR, e a funcional *subsystem hierarchical classification*. Quando selecionado a função desejada a anotação se deu da seguinte forma: anotação da *best hit classification* contra o banco de dados SEED. Todas análises foram feitas usando o BlastX com mínimo de alinhamento alinhamento 50 pb e o E-value cut-off de $e < 1 \times 10^{-5}$, e mínimo de identidade de 60% (SMITH et al., 2012). As Tabelas de frequência taxonômica e funcional, de cada metagenoma, foram exportadas e normalizadas pelo total de hits para remover *bias* sequenciamento preferencial de amostra.

Tabela 3.2 – Número de pares de bases (pb), número de sequências total e tamanho médio da sequências após controle de qualidade obtidos pelo *SeqyClean* e *FLASH* e MG-RAST pipeline

MG-RAST			Total	N. de	Tamanho
ID	Parcelas	Amostra	de pb	sequências	médio
4566889.3	Controle	C50	54.294.949	188.973	287
4566890.3	Controle	C52	96.192.153	344.456	279
4566893.3	Controle	C58	82.648.245	300.880	274
4571578.3	Controle	C60	200.520.755	763.717	262
4571576.3	Elevado CO ₂	C57	126.952.480	507.479	250
4571577.3	Elevado CO ₂	C59	73.370.018	275.905	262
4576060.3	Elevado CO ₂	C49	158.578.111	680.671	232
4576061.3	Elevado CO ₂	C51	66.677.553	244.540	272
4571574.3	Elevada T°C	C53	108.286.173	417.877	259
4571579.3	Elevada T°C	C61	93.328.436	341.743	273
4571580.3	Elevada T°C	C63	81.909.683	288.207	284
4576062.3	Elevada T°C	C55	173.151.436	615.770	281
4567551.3	eT+eC	C54	103.082.196	442.990	232
4567552.3	eT+eC	C56	47.863.992	204.957	233
4567554.3	eT+eC	C62	84.549.736	340.090	284
4577142.3	eT+eC	C64	41.824.116	150.076	278

eT+eC = elevada temperatura + elevada concentração de CO₂.

3.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo modelo linear e as médias comparadas pelo teste de Tukey LSD ($p < 0,05$). A distribuição normal e a homogeneidade da variância foram melhoradas pela transformação dos dados em Log₁₀, para satisfazer as necessidade de homogeneidade e variância dos atributos quando necessário. A correlação entre os dados ambientais e a comunidade microbiana foi aplicada usando o método não paramétrico de Spearman. As diferenças na abundância dos grupos taxonômicos entre os tratamentos foram

realizadas no *Statistical Analyses of Metagenomic Profiles* (STAMP) (PARCKS; BEIKO, 2010), usando o cálculo de *Fisher's exact test* e os valores de ($p > 0.01$) corrigidos Benjamini-Hochberg false discovery rate. As análises estatísticas foram processadas com auxílio do software R, usando os pacotes agricolae, ExpDes, MASS, ggplot2.

3.3 Resultados

3.3.1 Atributos físicos do solo

Os fatores físicos do solo que podem afetar o fluxo de gases, oscilaram entre macroporos (0.44 a $0.45 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$), microporos (0.14 a $0.18 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$), poros total (0.60 a $0.62 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$) e densidade (1.15 a 1.22 g.cm^{-3}), não resultando em diferenças entre os tratamentos avaliados pelo teste de TukeyLSD ($p < 0.05$). Entretanto, verificamos uma quantidade maior de macroporos que microporos em todos os tratamentos (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Média dos poros (macro, micro e poros total ($\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$)) e densidade do solo (g.cm^{-3}), em Trop-T-FACE. Amostras mensuradas com 27 dias após a instalação do experimento. Barras verticais indicam o desvio padrão. Controle (C), elevado CO_2 (eC), elevada T°C (eT), elevada $\text{T}^\circ\text{C} + \text{CO}_2$ (eT+eC), $n = 4$.

Os poros preenchidos por água oscilaram nos tratamentos entre 55 a 100% durante as onze semanas de experimento, com maior percentagem de poros preenchidos por água nos tratamentos controle (C) e elevado CO_2 (eC) (Figura

3.3A). A média geral dos poros preenchidos por água mostrou que os tratamentos com elevada temperatura (eT) 79% e combinado com elevado CO₂ (eT+eC) 80%, resultaram em menores quantidades de água disponível que os tratamentos C 82% e eC 87%, de poros preenchidos por água. A temperatura do solo oscilou de 16 a 23°C durante o período de amostragem. Claramente se percebe que a temperatura do solo foi superior nas parcelas com elevada temperatura eT e eT+eC (Figura 3.3B).

Figura 3.3 - Média dos poros preenchidos por água (A) e temperatura do solo (B) em Trop-T-FACE durante os 83 dias de experimento. Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 4)

3.3.2 Emissões de gases do efeito estufa

As emissões acumuladas de CH₄ não resultaram em efeito significativo ($p < 0.05$, Tukey) entre os tratamentos e a época de amostragem (Figura 3.4A).

Quanto às emissões médias de CO₂ de todas as parcelas, maiores valores das emissões ($p < 0.006$) de CO₂ para atmosfera foram de $(116,65 \pm 12,90, \text{média} \pm \text{desvio padrão}) \text{ mg CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ no primeiro dia que no dia 83 com emissão de $76,12 \pm 13,11 \text{ mg CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Figura 3.4B). O fluxo médio de N₂O resultou em maiores emissões no tempo inicial do experimento, $132,67 \pm 30,16 \mu\text{g N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, que logo após uma semana no sexto dia de experimento ($11,42 \pm \mu\text{g N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Entretanto, foram verificados dois períodos de maior fluxo, entre os dias (13 - 20) e (48 - 55) e nas últimas 4 semanas manteve-se estável, não ultrapassando os $43 \mu\text{g N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ emitidos para atmosfera (Figura 3.4C).

Após a primeira adição por cobertura de uréia, no dia 08, as emissões de N₂O foram incrementadas ($p < 0.05$) 3 vezes nas parcelas com elevada temperatura (eT), e 4 vezes nas parcelas com elevada temperatura e concentração de CO₂ (eT+eC) que nas parcelas controle (C), já na segunda aplicação de uréia, no dia 42, o fluxo de N₂O para atmosfera foi proporcionalmente maior para todos os tratamentos, com fluxos de N₂O, na mesma magnitude da primeira adição de uréia para todas as parcelas (Figura 3.4C).

Figura 3.4 - Emissões de CH_4 (A), CO_2 (B) e N_2O (C) em Trop-T-FACE durante os 83 dias de experimento. Controle (C), elevado CO_2 (eC), elevada T°C (eT), elevada $\text{T}^\circ\text{C}+\text{CO}_2$ (eT+eC). Barras verticais indicam o desvio padrão (n = 4)

3.3.3 Potencial de aquecimento global

O potencial de aquecimento global durante as onze semanas de experimento resultou em incremento ($p < 0.05$) nas parcelas eT 41%, eT+eC 37% e eC 28% quando comparados ao C (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Emissões acumulada dos gases CH₄ e N₂O e potencial de aquecimento global (GWP) em Trop-T-FACE durante os 83 dias de experimento

Parcelas	Gases		[†] GWP (mg Ceq. m ² h ⁻¹)
	CH ₄ (mg m ² h ⁻¹)	N ₂ O (mg m ² h ⁻¹)	
C	-0,34 ± 0,10 a	0,40 ± 0,18 b	110,38 ± 56,55 b
eC	0,04 ± 0,31 a	0,52 ± 0,15 ab	154,69 ± 41,13 ab
eT	0,05 ± 0,30 a	0,63 ± 0,08 a	189,12 ± 27,96 a
eT+eC	-0,24 ± 0,32 a	0,62 ± 0,09 a	177,99 ± 31,69 a

Controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada T°C (eT), elevada T°C+CO₂ (eT+eC)

Médias nas coluna seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de TukeyLSD $p < 0,05$. (Média ± desvio padrão, n = 4). [†]GWP (Potencial de aquecimento global (IPCC, 2007)).

3.3.4 Quantificação dos genes funcionais e 16S rRNA

O número de cópias do gene 16S rRNA Bacteria foi incrementado ao longo do tempo, sem verificar nenhum efeito do tratamento para o gene 16S, mas a análise de regressão mostrou acréscimo no número de cópias do gene 16S rRNA ao longo do experimento (Figura 3.5). A análise de regressão para o número de cópias de Archaea nitrificantes (AOA) não foi afetado ao longo do experimento, nem para os tratamentos (Figura 3.5). Entretanto, o número de cópias de bactérias nitrificantes (AOB) foi incrementado durante o decorrer do experimento, onde as maiores ($p < 0.05$) abundâncias foram verificadas nas últimas três amostragens aos 20, 55 e 76 dias (Figura 3.5). Quando comparada à abundância de cópias do gene 16S de bactérias nitrificantes existentes entre o solo e a rizosfera, observou maiores densidade do gene AOB no solo que na rizosfera da planta (Figura 3.6 e Tabela 3.4).

A densidade de cópias do gene *nifH* foi afetado ao longo do experimento ($p < 0.05$), e também pela elevada temperatura, sendo as maiores ($p < 0.05$) abundâncias do gene encontradas no tratamento eT (Figura 3.5, Tabela 3.4). O número de cópias do gene *nifH* resultou em maior ($p < 0.05$) abundância na rizosfera

que no solo (Figura 3.6). O número de cópias do gene *nosZ* resultou em maiores incrementos ($p < 0.001$) nos tratamentos com eT e com eT+eC quando comparado ao controle, e apresentou claro efeito no incremento de cópias do gene ao longo do experimento (Figura 3.5). Adicionalmente, o solo não rizosférico apresentou elevada densidade de cópias para o gene *nosZ* (Figura 3.6 e Tabela 3.4).

Quanto ao número de cópias do gene *pmoA*, responsável pela oxidação de CH_4 , não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mas foi drasticamente inibido ($p < 0.05$, TukeyHSD) durante o decorrer do experimento, obtendo 2.71 a $6.47\text{E}+10^6$ cópias do gene, no tempo inicial do experimento, e níveis entre 5.97 a 7.40×10^4 cópias do gene *pmoA*, no final (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Regressão linear do número de cópias dos genes g⁻¹ de solo seco (log₁₀) Bacteria (16S rRNA), *pmoA*, AOA, AOB, *nifH* e *nosZ* para o sistema Trop-T-FACE nos tempos (0, 6, 20, 55 e 76 dias após a instalação do experimento). Setas em vermelho indicam as fertilizações de uréia (60 kg N ha⁻¹) em cada aplicação

Tabela 3.4 - ANOVA da densidade de cópias dos genes e atributos químicos do solo, médias comparadas pelo teste de TukeyHSD $p < 0.05$.

genes	Solo		Rizosfera		Solo vs Rizosfera	
	F	p	F	p	F	p
16S rRNA	0.445	0.725	0,678	0,418	1.018	0.321
AOB	2.073	0.157	1.377	0.274	24.6	<0.001***
AOA	1,120	0.361	1.920	0.153	0.889	0.353
<i>nifH</i>	23.48	<0.001***	3.018	0.049*	20.38	<0.001***
<i>nosZ</i>	5.412	0.013*	0.984	0.417	51.84	<0.001***
<i>pmoA</i>	1.166	0.363	0.801	0.505	0.226	0.638
NH_4^+	0.360	0.783	4.077	0.017*	15.19	<0.001***
NO_3^-	0.433	0.734	5.931	0.003**	18.87	<0.001***
CH ₄	0.085	0.967	nd	nd	nd	nd
CO ₂	0.772	0.531	nd	nd	nd	nd
N ₂ O	13.79	<0.001***	nd	nd	nd	nd

controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada temperatura (eT), elevada T°C+CO₂ (eT+eC). Solo: solo (S), rizosfera (R). nd = não determinado. Solo (solo não rizosférico) e Rizosfera (solo rizosférico) = ambos solos foram coletados no final do experimento aos 83 dias da planta com metabolismo C₄ (*Panicum maximum*)

Figura 3.6 – Abundância de específicos genes funcionais no solo e na rizosfera de *Panicum maximum* no sistema Trop-T-FACE

3.3.5 Classificação taxonômica do solo

Um total de 6 108.331 de sequências foram obtidas de 16 amostras. Os grupos mais abundantes de Archaea foram *Euryarcheata*, *Thaumarcheota* e *Crenarcheota* (Figura 3.7), e Bacteria foram *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* (Figura 3.8). Dentre os grupos taxonômicos associados ao metabolismo do nitrogênio com efeito significativo afetados pela aplicação dos tratamentos *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Solibacteres*, e *Actinobacteria* foram os grupos com maior proporção relativa encontrados no presente estudo (Figura 3.9 α , β e δ). A proporção relativa de *Alphaproteobacteria* foi superior no tratamento controle (C) que em elevada concentração de CO₂ (eC) (Figura 3.9 α), e com elevada temperatura (eT) (Figura 3.9 β), enquanto que o tratamento com elevada temperatura e elevada

concentração de CO₂ (eT+eC) resultou em maior proporção de *Alphaproteobacteria* (Figura 3.9 **δ**). O grupo taxonômico *Deltaproteobacteria* mostrou proporções superiores no controle que em eT e eT+eC (Figura 3.9 **β**, **δ**). Esse mesmo grupo, resultou em proporção superior em eC quando comparado ao C (Figura 3.9 **α**). *Betaproteobacteria* mostrou uma abundância relativa superior ($p < 0.01$) na parcela C que em eC (Figura 3.9 **α**). Por outro lado, as parcelas eT resultaram em maior proporção de grupo *Betaproteobacteria* que nas parcelas C (Figura 3.9 **β**). Foi encontrado maior proporção de *Solibacteres* em eC que em C (Figura 3.9 **α**). e na comparação de controle com efeito da temperatura, as maiores proporções foram registradas em C que em eT (Figura 3.9 **β**). Quanto ao grupo taxonômico de *Actinobacteria* foi observado maiores abundâncias em eC, eT e eT+eC que em C (Figura 3.9 **α**, **β** e **δ**).

Figura 3.7 - Abundância relativa de Archaea no sistema Trop-T-FACE, entre os tratamentos: controle (C); elevada concentração CO₂ em 600 ppm (eC); elevada temperatura +2°C que ambiente (eT) e elevada temperatura e CO₂ (eT+eC), n = 4

Figura 3.8 - Abundância relativa de Bacteria no sistema Trop-T-FACE, para os tratamentos: controle (C); elevada concentração CO₂ em 600 ppm (eC); elevada temperatura +2°C que ambiente (eT); e elevada temperatura e CO₂ (eT+eC), n = 4

Figura 3.9 - Proporção de grupos taxonômicos no sistema Trop-T-FACE. Os dados foram obtidos usando MG-RAST e anotação feita com *Best Hit Classification* contra o SEED database com um cut-off de 60% e *E-value* de 1×10^{-5} . Valores de q foram corrigidos pelo método de *Benjamini-Hochberg false discovery rate* (FDR) a ($p < 0.01$). (α) Controle (C) vs elevada concentração CO_2 em 600 ppm (eC); (β) Controle vs elevada temperatura +2 que ambiente (eT); (δ) Controle vs e elevada temperatura e CO_2 (eT+eC).

3.3.6 Classificação funcional do solo

Foram encontradas um total de 28 categorias funcionais, mas selecionados somente o metabolismo de nitrogênio (Figura 3.10). O maior número de categorias funcionais significativas foram encontrados nas comparações de controle vs eC, e somente duas categorias resultaram em efeito significativo para as comparações entre controle vs eT e eT+eC (Figura 3.11 **α**, **β** e **δ**). Dentre as funções, foi possível visualizar que a abundância de genes referente a assimilação de amônia resultou em maior ($p < 0.01$) proporção nas parcela eC, quando comparado com C (Figura 3.11 **α**). O inverso foi observado quando comparado as parcelas C vs eT+eC (Figura 3.11 **β**). Também foi encontrada maior proporção ($p < 0.01$) de genes envolvidos com estresse nitrosativo e desnitrificação nas parcelas em eT que em C (Figura 3.11 **β**). As maiores proporções de genes envolvidos com a desnitrificação, foi verificado nas parcelas em eT e eT+eC que nas parcelas C (Figura 3.11 **β** e **δ**).

Figura 3.10 - Abundância relativa das categorias funcionais no sistema Trop-T-FACE, para os tratamentos: controle (C); elevada concentração CO₂ em 600 ppm (eC); elevada temperatura +2°C que ambiente (eT); e elevada temperatura e CO₂ (eT+eC), n = 4. A anotação dos dados foram geradas usando o MG-RAST contra *subsystem hierarchy* nível 1 *database* com um cut-off de 60% e *E-value* de 1×10^{-5}

Figura 3.11 - Diferença estatística baseado em funcional subsystems relacionadas ao metabolismo de nitrogênio nível 3, anotação foi feita usando o MG-RAST contra *subsystem hierarchy database* com um cut-off de 60% e *E-value* de 1×10^{-5} . STAMP para comparação entre controle com eC, eT e eT+eC Trop-T-FACE. Valores de q foram corrigidos pelo método de Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) a ($p < 0.01$). (α) Controle (C) vs elevada concentração CO₂ em 600 ppm (eC); (β) Controle vs elevada temperatura +2 que ambiente (eT); (δ) Controle vs e elevada temperatura e CO₂ (eT+eC)

3.3.7 Diversidade taxonômica e funcional do solo

A diversidade taxonômica em nível de filo não resultou em diferenças ($p > 0.05$) nas diferentes parcelas (Figura 3.12). No entanto, a diversidade funcional resultou em menores ($p < 0.05$) índices de diversidade para a parcela C que nas demais parcelas (Figura 3.12).

Figura 3.12 - Índice de diversidade de Shannon da categoria funcional metabolismo do nitrogênio nível 3 (*Subsystem Hierarchy*) e dos grupos taxonômicos envolvidos com metabolismo de nitrogênio (anotados pelo *Best Hit Classification* contra o *SEED database*) no Trop-T-FACE, entre os tratamentos: Controle (C), elevada concentração CO₂ em 600 ppm (eC), elevada temperatura +2°C que ambiente (eT) e elevada temperatura e CO₂ (eT+eC). ns = não significativo e ** = significativo pelo teste de TukeyLSD $p < 0.05$, $n = 4$

3.3.8 Correlação entre os gases do efeito estufa com os atributos ambientais e biológicos

Nenhuma correlação com efeito significativo foi encontrado entre os gases do efeito estufa e as fontes de nitrogênio no solo, NH₄ e NO₃. Quanto aos genes funcionais foi possível observar que o gene AOB resultou em correlações negativas ($p < 0.05$) com CO₂ ($r^2 = -0.56^{**}$) e N₂O ($r^2 = -0.58^{**}$) (Tabela 3.5). Por outro lado, o gene *nosZ* resultou em correlações positivas ($p < 0.05$) ($r^2 = 0.52^{**}$) com N₂O. E a abundância relativa dos grupos de *Alphaproteobacteria* resultou em altas correlação positivas com ($p < 0.05$) CO₂ ($r^2 = 0.55^{**}$) e N₂O ($r^2 = 0.48^*$). Por outro lado, *Deltaproteobacteria*, e *Gammaproteobacteria* resultaram em correlações negativas com CO₂ e N₂O. E a categoria funcional dos genes envolvidos na desnitrificação resultaram em alta relação ($p < 0.05$) com os fluxos de N₂O ($r^2 = 0.61^{**}$) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Correlação de Pearson entre os genes, parâmetros ambientais, biológicos e gases do efeito estufa

Atributos do solo	CH ₄	CO ₂	N ₂ O
Nitrogênio			
NH ₄	0.01	0.14	0.28
NO ₃	0.14	-0.28	-0.28
Genes funcionais			
<i>pmoA</i>	-0.41	-0.26	-0.35
AOB	0.36	-0.56**	-0.58**
AOA	0.00	-0.36	0.02
<i>nosZ</i>	-0.05	0.15	0.52**
Grupos Taxonômicos			
<i>Alphaproteobacteria</i>	-0.54*	0.55**	0.48*
<i>Betaproteobacteria</i>	0.13	-0.25	-0.14
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.03	-0.48*	-0.56**
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.35	-0.49*	-0.56
Categoria funcional*			
Desnitrificação	0.25	0.46	0.61**

*Para correlação entre gases do efeito estufa e a categoria funcional foram realizados com a seleção dos genes, oriundo da funções metabolismo de nitrogênio nível 3.

3.4 Discussão

Akiyama et al. (2014) observaram que os maiores valores de densidade do solo podem implicar em incrementos no consumo de metano (CH₄) pelo mesmo. Geralmente, em sistemas agrícolas há maior consumo que emissão de CH₄ (SMITH et al., 2008). Morales et al. (2015) estudaram as emissões de N₂O e observaram que as características físicas do solo podem modular as emissões de gases do solo para atmosfera. Interessantemente, não encontramos diferenças entre os fatores físicos do solo (poros total e densidades do solo), isso indica que as emissões observadas neste estudo foram modulares dos fatores temperatura e elevada concentração de CO₂ ou das doses de N, aplicadas em cobertura as plantas durante o experimento.

Outro fator que pode ter contribuído efetivamente para o fluxo de gases, pode

ter sido a quantidade de poros preenchidos por água (WFPS) no solo. Melhorando a eficiência e uso da água pelas plantas, reduzindo a disponibilidade de água no solo através da transpiração, isso parece ter limitado o acesso da microbiota do solo ao substrato, e tenha induzido o aumento das emissões de CO₂, consequentemente, limitando o acúmulo de C, principalmente, nas parcelas com elevada temperatura (GROENIGEN, et al., 2014). Varela et al. 2004 também relataram que os maiores pulsos de N₂O foram obtidos após a adição de água ao solo. Adicionalmente, observamos maiores oscilações de CH₄ após 48 dias de experimento, coincidindo com a segunda aplicação de uréia e com o pico da emissão de N₂O (AKIYAMA et al., 2014).

Estudos sobre o efeito do da aplicação de N fertilizante nitrogenado mostram, que doses acima de 100 kg de N ha⁻¹ podem inibir os grupos que oxidação de CH₄, e doses abaixo de 100 Kg de N ha⁻¹ podem estimular os grupos que oxidação do CH₄ (AKIYAMA et al., 2014). Os resultados obtidos neste estudo, estão de acordo, uma vez que foram aplicados 120 Kg de N ha⁻¹, divididos em duas aplicações, uma no dia 6 e outra, no dia 41, e observamos a inibição do número de cópias do gene *pmoA* ($r^2 = -0.48$, $p < 6.127 \times 10^{-6}$, Pearson's) pela adição de N. Após a segunda adição de N percebeu-se maior oscilação nos valores de consumo ou produção de CH₄. Resultados recentes, mostram que a intensidade que grupos produtores (*mcrA*) e (*pmoA*) oxidadores de CH₄ podem ser estimulados em experimentos com fertilização de N por 22 anos consecutivos mesmo em doses de 183 Kg de N ha⁻¹. (SU et al., 2015). No presente estudo, o número de cópias dos genes 16S rRNA, *nifH*, AOB e *nosZ* tiveram suas densidades incrementadas ao longo do tempo no solo.

Reay et al. (2012) relatam que os solos agrícolas com aplicação de fertilizantes possam incrementar as emissões dos GEE em aproximadamente 1.1 Tg de N-N₂O ano⁻¹ até 2030. Nossos resultados sugerem que caso isso aconteça, junto a adição de fertilizantes sintéticos nitrogenados, possa ocorrer incrementos de 3 a 4 vezes mais fluxo de N₂O para atmosfera durante uma semanas, após a fertilização por cobertura de N. Estes resultados podem causar sérios incrementos nas emissões de N₂O. Isso aconteceria, principalmente, pelo efeito do aumento da temperatura, combinada com maior concentração de CO₂ (eT+eC). Nas condições experimentais deste estudo, as parcelas com aumento da temperatura e elevada concentração de CO₂ apresenta um aumentou nas emissões de N₂O para atmosfera em até 270% a mais que as emissões verificadas nas parcelas controle (C).

Similarmente, Burzaco et al. (2013) verificaram que a maior resposta das emissões de N₂O foram obtidas após a adição de fertilizante nitrogenado.

O efeito da temperatura no aumento do número de cópias do gene *nosZ* já havia sido relatado por Zhou et al. (2011), assim, como o não efeito significativo sobre os genes *amoA*. Esses mesmos autores verificaram que a respiração em parcelas aquecidas diminuía. De acordo com estudos recentes, nossos resultados também não resultaram em significativas diferenças no fluxo de CO₂. A densidade dos genes *pmoA* foi diminuindo com o avançar do experimento, em todas parcelas controle (C), elevada concentração de CO₂ (eC), elevada temperatura (eT) e e nas parcelas combinadas com (eT+eC). Esses resultados podem ser explicados pela aplicação de uréia, que possivelmente possa ter bloqueado a enzima amônia monoxigenase, a qual codifica o gene *amoA*.

As emissões de N₂O e a abundância de *Alphaproteobacteria* foram altamente correlacionados, indicando que este grupo pode ter contribuído com as emissões de N₂O. Por outro lado, a abundância de *Deltaproteobacteria* foi negativamente correlacionada com as emissões de N₂O, sugerindo que este grupo pode ter controlado as emissões de gases do solo. Similarmente, Drigo et al. (2010) e Deng et al. (2012) mostraram que a comunidade microbiana respondeu ao incremento de CO₂ atmosférico, e que o *Alphaproteobacteria* foi relativamente incrementada quando alterada a concentração de CO₂ atmosférico. Navarrete et al. (2015) verificaram que *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foram os grupos mais expressivos relacionados com o metabolismo de nitrogênio no solo.

Adicionalmente, o efeito provocado pelo aquecimento e o elevado CO₂ (eT+eC) pode ter provocando uma menor atividade do gene para a assimilação de amônio e aumentando a desnitrificação, provocando um aumento nas emissões de N₂O para atmosfera. Desta forma, verificamos que ao longo do tempo o *nosZ* pode ter controlado as emissões de N₂O para atmosfera, as amostragem ao longo do tempo, mostraram que as diferenças entre C e eT+eC foram sendo reduzidas de 60% no início do experimento, a 30% no final do experimento, e o número de cópias do gene *nosZ* foi aumentando progressivamente.

3.5 Considerações finais

O incremento na temperatura e a elevada concentração de CO₂ (eT+eC) podem aumentar a diversidade funcional do solo, e, conseqüentemente, as emissões de N₂O e o potencial de aquecimento global. Entretanto, parece possível que ao longo do tempo a quantidade de cópias do gene *nosZ* pode ser incrementada indicando maior capacidade em controlar as emissões de N₂O para a atmosfera. As doses de N em forma de uréia podem ter inibido o crescimento dos grupos responsáveis pela oxidação de CH₄. Adicionalmente, os resultados obtidos pelo revelaram que a abundância de *Alphaproteobacteria* pode estar associadas às emissões de N₂O, principalmente, quando ocorrem acréscimos na temperatura combinada com maior concentração de CO₂ atmosférico, alterando a comunidade microbiana do solo, assim como as funções atribuídas a ela.

Referências

- AHN, J.H.; CHOI, M.Y.; KIM, B.Y.; LEE, J.S.; SONG, J.; KIM, G.Y.; WEON, H.Y. Effects of water-saving irrigation on emissions of greenhouse gases and prokaryotic communities in rice paddy soil. **Microbiology Ecology**, New York, v. 68, n. 2, p. 271–83.
- AKIYAMA, H.; MORIMOTO, S.; TAGO, K.; HOSHINO, Y.T.; NAGAOKA, K.; YAMASAKI, M.; KARASAWA, T.; TAKENAKA, M.; HAYATSU, M. Relationships between ammonia oxidizers and N₂O and CH₄ fluxes in agricultural fields with different soil types. **Soil Science and Plant Nutrition**, London, v.60, n. 4, p. 1–10, 2014.
- ATTARD, E.; RECOUS, S.; CHABBI, A.; DE BERRANGER, C.; GUILLAUMAUD, N.; LABREUCHE, J.; PHILIPPOT, L.; SCHMID, B.; LE ROUX, X. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1975-1989, 2011.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Relatórios de referência: emissões de óxido nitroso de solos agrícolas e manejo de dejetos**. 2013. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310922.html>>. Acesso em: 13 abr. 2013.
- BURZACO, P.J.; SMITH, D.R.; VYN, T.J. Nitrous oxide emissions in Midwest US maize production vary widely with band-injected N fertilizer rates, timing and nitrapyrin presence. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.

BUTTERBACH-BAHL, K.; BAGGS, E.M.; DANNENMANN, M.; KIESE, R.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series, Biological Sciences**, London, v. 27, n. 368, p. 1-13, 2013.

DENG, Y.; HE, Z.; XU, M.; QIN, Y.; van NOSTRAND J.D.; WU, L.; ROE, B.A.; WILEY, G.; HOBBIE, S.E.; REICH, P.B.; ZHOU, Z. Elevated carbon dioxide alters the structure of soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, n. 8, p. 2991-2995, 2012.

DRIGO, B.; PIJL, A.S.; DUYTS, H.; KIELAK, A.; GAMPER, H.A.; HOUTEKAMER, M.J.; BOSCHKER, H.T.S.; BODELIER, P.L.E.; WHITELEY, A.S.; van VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 24, p. 10938-10942, 2010.

HARTER, J.; KRAUSE, H.-M.; SCHUETTLER, S.; RUSER, R.; FROMME, M.; SCHOLTEN, T.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Linking N₂O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 8, p. 660–674, 2014.

HUTCHINSON, G. L., MOSIER, A. R. Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 45, n. 2, p. 311–316, 1981.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Summary for policymakers. In: _____. **Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability**. Part a: global and sectoral aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 1-32.

KIMBALL, B.A.; CONLEY, M.M.; WANG, S.; LIN, X.; LUO, C.; MORGAN, J.; SMITH, D. Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. **Global Change Biology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 309–320, 2008.

LUO J.; de KLEIN C.A.M.; LEDGARD S.F.; SAGGAR, S. Management options to reduce nitrous oxide from intensively grazed pasture: a review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 136, n. 3/4, p. 282-291, 2010.

MERGEL, A.; KLOOS, K.; BOTHE, H. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N₂-fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 230, n. 1, p. 145-160, 2001.

MONTZKA, S.A.; DLUGOKENCKY, E.J.; BUTLER, J.H. Non-CO₂ greenhouse gases and climate change. **Nature**, London, v. 476, n. 1, p. 43–50, 2011.

MORALES, S.E.; COSART, T.; HOLBEN, W.E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 8, p. 799–808, 2010.

MORALES, S.E.; JHA, N.; SAGGAR, S. Biogeography and biophysicochemical traits link N₂O emissions, N₂O emission potential and microbial communities across New Zealand pasture soils. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 87–98, 2015.

MOSIER, A.; WASSMANN, R.; VERCHOT, L.; KING, J.; PALM, C. Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms. **Environment, Development and Sustainability**, London, v. 6, n. 1/2, p. 11–49, 2004.

NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M.; MENDES, L.W.; FAUST, K.; de HOLLANDER, M.; CASSMAN, N.A.; RAES, J.; van VEEN, J.A.; KURAMAE, E.E. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 2433–2448, 2015.

NIE, M.; PENDALL, E.; BELL, C.; GASCH, C.K.; RAUT, S.; TAMANG, S.; WALLENSTEIN, M.D. Positive climate feedbacks of soil microbial communities in a semiarid grassland. **Ecology Letters**, Oxford, v.16, n. 2, p. 234–241, 2013.

PETERSEN, D. G.; BLAZEWICZ, S. J.; FIRESTONE, M.; HERMAN, D. J.; TURETSKY, M.; WALDROP, M. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n.4, p. 993–1008, 2012.

PHILIPPOT, L.; SPOR, A.; HÉNAULT, C.; BRU, D.; BIZOUARD, F.; JONES, C.M.; SARR, A.; MARON, P.A. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 1, p. 1609–1619, 2013.

RAVISHANKARA, A.R.; DANIEL, J.S.; PORTMANN, R.W. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. **Science**, New York, v. 326, n. 5949, p. 123–127, 2009.

REAY, D.S.; DAVIDSON, E.A.; SMITH, K.A.; SMITH, P.; MELILLO, J.M.; DENTENER, F.; CRUTZEN, P.J. Global agriculture and nitrous oxide emissions. **National Climate Change**, London, v. 2, n. 1, p. 410–416, 2012.

RICHARDSON, D.; FELGATE, H.; WATMOUGH, N.; THOMSON, A.; BAGGS, E. Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle—could enzymic regulation hold the key? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 7, p. 388–397, 2009.

SANFORD, R.A.; WAGNER, D.D.; WU, Q.; CHEE-SANFORD, J.C.; THOMAS, S.H.; CRUZ-GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, G.; MASSOL-DEYÁ, A.; KRISHNANI, K.K.; RITALAHTI, K.M.; NISSEN, S.; KONSTANTINIDIS, K.T.; LÖFFLER, F.E. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in

soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 48, p. 19709–19714, 2012.

SMITH, P.; MARTINO, D.; CAI, Z.; GWARY, D.; JANZEN, H.; KUMAR, P.; MCCARL, B.; OGLE, S.; O'MARA, F.; RICE, C.; SCHOLLES, B.; SIROTENKO, O.; HOWDEN, M.; MCALLISTER, T.; PAN, G.; ROMANENKOV, V.; SCHNEIDER, U.; TOWPRAYOON, S.; WATTENBACH, M.; SMITH, J. Greenhouse gas mitigation in agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series, Biological Sciences**, London, v. 363, n. 27, p. 789–813, 2008.

SMITH, R.J.; JEFFRIES, T.C.; ROUDNEW, B.; FITCH, A.J.; SEYMOUR, J.R.; DELPIN, M.W.; NEWTON, K.; BROWN, M.H.; MITCHELL, J.G. Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.14, n. 1, p. 240–253, 2012.

SNYDER, C.; DAVIDSON, E.; SMITH, P.; VENTEREA, R. Agriculture: sustainable crop and animal production to help mitigate nitrous oxide emissions. **Current Opinion Environmental Sustainable**, Maryland Heights, v. 9/10, p. 46–54, 2014.

STONE, M.M.; KAN, J.; PLANT, A.F. 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**, Oxford, v. 80, n. A1, p. 273–282, 2015.

SU, J.K.; DING, L.J.; XUE, K.; Yao, H.Y.; QUENSEN, J.; BAI, S.J.; WEI, W.X.; WU, J.S.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M.; ZHU, Y.G. Long-term balance fertilization increase the soil microbial functional diversity in a phosphorous-limited paddy soil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 24, n. 1, p.136-150. 2015.

SYAKILA, A.; KROEZE, C. The global nitrous oxide budget revisited. **Greenhouse Gas Measurement and Management**, London, v. 1, n. 1, p. 17–26, 2011.

VARELLA, R.F.; BUSTAMANTE, M.M.C.; PINTO, A.S.; KISSELLE, K.W.; SANTOS, R.V.; BURKE, R.A.; ZEPP, R.G.; VIANA, L.T. Soil fluxes of CO₂, CO, NO, and N₂O from an old pasture and from native savanna in Brazil. **Ecological Applications**, Washington, 14(4), p. 221–231, 2004.

van GROENIGEN, K.J.; QI, X.; OSENBERG, C.W.; LUO, Y.; HUNGATE, B.A. Faster Decomposition under increase atmospheric CO₂ limits soil carbon storage. **Scientific Reports**, London, v. 344, n. 6183, p. 508-509, 2014.

van RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise Química Para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Instituto Agrônômico de Campinas: Campinas, Brazil, 2001, 284.pp.

XIONG, J.; HE, Z.; SHI, S.; KENT, A.; DENG, Y.; WU, L.; VAN NOSTRAND, J.D.; ZHOU, J. Elevated CO₂ shifts the functional structure and metabolic potentials of soil microbial communities in a C4 agroecosystem. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 1, p. 9316, 2015.

ZHOU, J.; XUE, K.; XIE, J.; DENG, Y.; WU, L.; CHENG, X.; FEI, S.; DENG, S.; HE, Z.; VAN NOSTRAND, J. D.; LUO, Y. Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming. **Nature Climate Change**, London, v. 2, n. 1, p. 106–110, 2011.