

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARISTELA CALVENTE MORAIS

Efeitos da conversão pastagem-canavial e da intensificação do sistema de
pastagem na microbiota do solo associada ao ciclo do nitrogênio

Piracicaba

2020

MARISTELA CALVENTE MORAIS

Efeitos da conversão pastagem-canavial e da intensificação do sistema de
pastagem na microbiota do solo associada ao ciclo do nitrogênio

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no
Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Martinelli

Piracicaba

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Morais, M. C.

Efeitos da conversão pastagem-canavial e da intensificação do sistema de pastagem na microbiota do solo associada ao ciclo do nitrogênio / Maristela Calvente Moraes; orientador Luiz Antonio Martinelli. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018de 2011. - - Piracicaba, 2020.

96 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

1. Cana-de-açúcar 2. Ciclo do nitrogênio 3. Comunidades microbianas 4. Desnitrificação 5. Microbiologia do solo 6. Nitrificação 7. Óxido nitroso 8. Pastagens 9 Uso do solo I. Título

CDU (579.266.2 + 631.461) : 631.585

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Ofereço a ELE, o Caminho, a Verdade e a Vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ser o sentido maior na minha vida. Tal como a prata unida ao ouro, a união com Deus enobrece, engrandece e purifica.

Ao meu *querido* orientador Dr. Luiz Antonio Martinelli, por acreditar e confiar no meu trabalho, por ser inspiração na minha formação profissional e em especial pelos encorajamentos que tanto me *ensinaram*.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Ecologia Isotópica pelos auxílios técnico e burocrático prestados.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Isotópicas pelas aprendizagens e momentos de alegria compartilhados.

À Dra. Tsai Siu Mui, ao Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio técnico e intelectual sempre oferecidos.

Ao Dr. Diego Riaño-Pachón, ao Dr. Fernando Andreote, ao Dr. Acácio Navarrete e à Dra. Andressa Venturini pelo tempo disponibilizado no esclarecimento de noções.

À Dra. Janaina Braga e seu grupo de pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, em especial à Dra. Camila Bento pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Antonio (Alemão) e Rudolf pelo auxílio imprescindível nas coletas de solo.

Aos proprietários da Fazenda Flores pelo espaço cedido para a condução do experimento.

À Dra. Eiko Eurya Kuramea por aceitar me coorientar no exterior e por me receber com grande hospitalidade no Instituto de Ecologia Holandês, ao seu grupo de pesquisa, em especial à Agata Pijl, Mattias de Hollander e Letusa Momesso, e a todo o Departamento de Ecologia Microbiana pelos ensinamentos.

Ao Grupo da Mãe Rainha da ESALQ por proporcionar as visitas da Mãe, Rainha e Vencedora Três Admirável de Schoenstatt, ao meu lar.

Aos meus tão amados sobrinhos e afilhados, *Alice* e *Francisco*, por serem a alegria que impulsiona os passos que sigo.

À minha família, em especial aos meus pais, Neide e Douglas, e à minha irmã, Lívia, por me acolher, me acalmar, me ensinar e me amar em todos os momentos.

À Marília Henyei pela formatação do trabalho e pronta disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários Gilson Costa, Cleide Lopes, Marcos Lopes e Magali da Silva pelo auxílio nos processos burocráticos, e por toda atenção e gentileza nos atendimentos prestados ao longo de todos esses anos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós Graduação em Ciências pela excelência nos serviços prestados e pelo comprometimento com o ensino e a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Projeto 2015/18790-3) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Sem o *amor*, todas as obras nada valem”
(SANTA TERESA DO MENINO JESUS).

RESUMO

MORAIS, M. C. **Efeitos da conversão pastagem-canavial e da intensificação do sistema de pastagem na microbiota do solo associada ao ciclo do nitrogênio.** 2020. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

O Brasil é líder mundial na produção do etanol de cana-de-açúcar e possui uma área de aproximadamente 9,8 milhões de hectares voltada para atividade sucroalcooleira. Preocupações crescentes com a expansão do cultivo de cana-de-açúcar dirigido ao etanol no Brasil levam à busca de conhecimento sobre os custos e benefícios do biocombustível para o ambiente e a sociedade. Para evitar o avanço da cana-de-açúcar sobre biomas brasileiros, a cultura poderia expandir em áreas de pastagens subutilizadas. Por meio da intensificação do manejo dos sistemas de pastagens, o mesmo número de animais seria alocado em uma área menor. Uma forma de realizar este processo de “intensificação do sistema de pastagens” é pelo uso de fertilizante mineral nitrogenado, visando aumentar a produtividade e qualidade da forragem. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da conversão pastagem-canavial e da intensificação do sistema de pastagem via fertilizante nitrogenado no ambiente do solo. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e abundância das comunidades microbianas do solo associadas ao ciclo do nitrogênio na conversão pastagem-canavial e a intensificação do sistema de pastagem e cana-de-açúcar. Para tanto foi conduzido um experimento de campo no município de Salto de Pirapora-SP, em um Latossolo vermelho de textura argilosa. O delineamento experimental utilizado foi em blocos randomizados, com quatro tratamentos e quatro repetições, sendo pastagem extensiva subutilizada sem adições de fertilizantes orgânicos e minerais e correções de solo (P-); pastagem intensiva com adição de fertilizantes e correções de solo (P+); cana-de-açúcar sem aplicação de fertilizantes padrão (S-); e cana-de-açúcar com aplicação de fertilizantes padrão (S+). As coletas de solo foram realizadas na profundidade 0-10 cm da superfície em todos os tratamentos previamente à aplicação de fertilizantes (novembro de 2017) e posteriormente ao longo do tempo (entre novembro de 2017 e julho de 2018), no período que compreendeu a quarta soqueira da cana-de-açúcar. Para a análise das comunidades microbianas do solo, foram utilizadas as abordagens de PCR quantitativo em tempo real e sequenciamento de fragmentos de 16S rRNA e da região ITS de fungos. Análises físicas, de fertilidade e das formas inorgânicas de nitrogênio assim como das concentrações de C e N do solo foram realizadas. As abundâncias dos genes associados à nitrificação e desnitrificação foram sensíveis à conversão pastagem-cana-de-açúcar, porém não foram alteradas pela aplicação de fertilizantes. Os genes *amoA*, de arqueias e bactérias, foram mais abundantes no solo sob cana-de-açúcar do que sob pastagem. Enquanto os genes *nirS* e *nosZ* (clado I) foram mais abundantes na pastagem do que na cana-de-açúcar. A população de arqueias foi aumentada devido à mudança de uso de solo de pastagem para cana-de-açúcar ao passo que a abundância de fungos não teve resposta ao manejo com fertilização ou uso do solo. Dessa forma, concluiu-se que as comunidades do solo associadas ao ciclo do nitrogênio foram mais sensíveis à mudança de cobertura e uso do solo do que à aplicação de fertilizantes.

Palavras-chave: Uso do solo. Diversidade microbiana. Nitrificação. Desnitrificação. Óxido nítrico.

ABSTRACT

MORAIS, M. C. **Effects of pasture-sugarcane conversion and intensification of pasture system on soil microbiota associated with nitrogen cycling**. 2020. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

Brazil is worldwide leader in sugarcane ethanol production with an area of about 9.8 million hectares devoted to sugar-alcohol activities. Increasing concerns with sugarcane expansion for ethanol in Brazil have led to pursuit knowledge about the social and environmental costs and benefits associated with biofuel. To avoid the advancing of sugarcane production over Brazilian biomes, biofuel crop expansion could use underutilized pasturelands. Through the intensification of pastureland system management, the same number of animals should be accommodated in a smaller area. One way to promote the process of “pasture intensification” is the use of mineral nitrogen fertilizer, aiming the improvement of biomass productivity and quality. However, there is a lack of knowledge about the effects of pasture-sugarcane conversion and pasture intensification with nitrogen fertilizer over soil environment. The goal of this study was to evaluate the diversity and abundance of soil microbial communities associated to nitrogen cycle under pasture-sugarcane conversion and pasture and sugarcane intensification. Therefore, a field experiment was set at the Salto de Pirapora municipality of São Paulo State, on a loamy red Oxisol. The experiment design was a randomized block with four treatments and four repetitions. The treatments were underutilized pasture without fertilizers application and soil corrections (P-); intensified pasture with fertilizer application and soil corrections (P+); sugarcane without fertilizer application (S-); and sugarcane with fertilizer application (S+). Soil was sampled in the 0-10 cm surface layer in each treatment previously fertilizer application (November 2017) and later time (from November 2017 to July 2018), during the fourth ratoon of sugarcane. PCR real time and amplicon sequencing of 16S rRNA and fungal ITS were used to analyze soil microbial community. Soil physical, fertility, inorganic nitrogen as C and N concentration analyses were conducted. Genes abundance associated with nitrification and denitrification responded to pasture-sugarcane conversion, however those genes were not changed by fertilizer application. Bacteria and archaea *amoA* genes were more abundant under sugarcane soil than under pasture soil. On the other hand, *nirS* and *nosZ* (clade I) were more abundant under pasture soil than under sugarcane soil. Archaea population was raised due to land use change from pasture to sugarcane while fungi abundance had no response to fertilizer management or land use. Therefore, it is possible to conclude that soil microbiota associated with nitrogen cycling were more sensitive to land use change than to fertilizer application.

Keywords: Land use. Microbial diversity. Nitrification. Denitrification. Nitrous oxide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipótese e objetivos	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O ciclo do nitrogênio	19
2.2 Influências antropogênicas no ciclo do nitrogênio	21
2.3 O papel da comunidade microbiana do solo no ciclo do N.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Área de estudo e desenho experimental	29
3.2 Manejo de pastagem e cana-de-açúcar.....	33
3.3 Amostragem do solo	35
3.4 Caracterização química do solo	36
3.5 Extração de DNA do solo.....	41
3.6 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR).....	41
3.7 Sequenciamento de fragmento dos genes 16S rRNA e ITS de fungos	45
3.8 Análise dos dados	45
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Abundância dos grupos microbianos no solo.....	49
4.2 Composição das comunidades microbianas nos diferentes usos de solo	55
4.3 Diversidade alfa das comunidades de bactérias e fungos do solo	60
4.4 Diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos do solo.....	61
4.5 Fluxos de óxido nitroso (N₂O)	64
4.6 Concentração de amônio e nitrato no solo sob os diferentes usos.....	65
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Resposta dos microrganismos nitrificadores à mudança do uso de solo e fertilização	67
5.2 Resposta dos microrganismos desnitrificadores à mudança do uso de solo e fertilização.....	71
5.3 Resposta da diversidade de microrganismos à mudança de uso do solo e fertilização	74

6. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	93
Apêndice A	95
Apêndice B	96

1. INTRODUÇÃO

O uso de biocombustíveis produzidos a partir de biomassa surgiu como alternativa para substituir os combustíveis fósseis e mitigar os impactos ambientais causados pela produção de energia fóssil, sobretudo os efeitos associados à emissão de gases do efeito estufa (GEE). O Brasil é líder mundial na produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar, com atuais 27,9 bilhões de litros produzidos por ano (CONAB, 2020), que tem potencial para competir com os combustíveis fósseis. No entanto, projeções apontam que seria necessária uma produção de 37,4 a 70,7 bilhões de litros de etanol de cana-de-açúcar em 2030 dependendo do cenário de demanda pelo biocombustível brasileiro e um aumento entre 1,2 e 5 milhões de hectares da área de produção de cana-de-açúcar (ANDRADE, 2019).

A necessidade de expansão da cana-de-açúcar tem levado a preocupações com os impactos ambientais e sociais relacionados à produção em larga escala de biomassa para geração de biocombustível (e.g. MARTINELLI; FILOSO, 2009). Ainda que o uso do etanol de cana-de-açúcar no Brasil traga benefícios climáticos para o ambiente ao reduzir as emissões de GEE em substituição dos combustíveis (BÖRJESSON, 2009), a aceleração das mudanças de uso da terra para produção de biomassa tem sido motivo de inquietação por ser um dos principais causadores de emissão de CO₂-equivalente no Brasil (CERRI et al., 2009). A perda de carbono do solo pela conversão direta ou indireta do uso de terra em cultivo por cana-de-açúcar (LAPOLA et al., 2010) não deve neutralizar os benefícios dos biocombustíveis comparado aos impactos da queima de combustíveis fósseis (IPCC, 2011).

Embora tenha sido mostrado que novas práticas de manejo para o cultivo de cana-de-açúcar otimizam os benefícios ambientais em relação às práticas convencionais (LA SCALA; BOLONHEZI; PEREIRA, 2006), é preciso garantir que a expansão da cana-de-açúcar voltada ao etanol não ameace a preservação dos biomas nativos brasileiros, a biodiversidade ou a segurança alimentar, diminuindo a viabilidade do biocombustível como alternativa sustentável (TILMAN et al., 2009; CALDARELLI; GILIO, 2018). A expansão da cana-de-açúcar em áreas de pastagem degradadas ou subutilizadas diminui a competição por terras para cultivo de alimentos e não contribui para o desmatamento direto (BORDONAL et al., 2018). Tal estratégia é especialmente atrativa para o Brasil, que possui uma cobertura de pastagem nativas ou implantadas de aproximadamente 170 milhões de hectares e uma produtividade muito abaixo do real potencial (DIAS-FILHO, 2014).

A área voltada à pecuária no Brasil abriga um rebanho bovino de 214,7 milhões de cabeças, apresentando o segundo maior rebanho bovino do mundo (IBGE, 2019). Estima-se que, nesta região, a maior parte da área de pastagem (40%) possui taxa de lotação de até 0,4 unidade de animal por hectare (UA) (DIAS-FILHO, 2014). E, portanto, em ordem de liberar o espaço subutilizado para outras formas de uso, é necessário acomodar o mesmo número de cabeças de animais em uma área menor. O aumento do estoque de gado pode ser alcançado por melhorias na produtividade da pastagem, que incluem a intensificação do sistema por meio do manejo com fertilizantes. Visto que no Brasil em torno de 60 milhões de hectares das áreas de pastagem estão em estágio de degradação ou subutilização, a intensificação da pastagem reduz a necessidade de desmatamento da vegetação nativa e provê espaços necessários para o avanço da agricultura e da cana-de-açúcar para etanol (BORDONAL et al., 2018).

Ainda que o aumento da produção de cana-de-açúcar ocorra apenas sobre áreas liberadas pela intensificação da pastagem, a literatura mostra que estas conversões têm efeitos sobre o solo e o ambiente. As mudanças do uso da terra associadas à conversão das áreas de pastagem em cana-de-açúcar influenciam, por exemplo, a estrutura e a qualidade do solo (BORDONAL et al., 2017; LUZ et al., 2019; CANISARES et al., 2020). Além disso, a intensificação da pastagem por fertilização altera a fertilidade e as frações de potássio e carbono do solo, com potencial de aumentar as emissões de CO₂-equivalente para a atmosfera (BENTO et al., 2018; DAMIAN et al., 2020; TAVANTI et al., 2020). No entanto, os conhecimentos sobre os impactos causados pela mudança de uso da terra devido ao aumento da cana-de-açúcar no Brasil ainda são limitados, sobretudo em relação aos aspectos biológicos do solo (CHERUBIN et al., 2016).

Atualmente, maior atenção tem sido dada para as características biológicas do solo, sobretudo as relacionadas com a composição microbiana, considerada essencial para manutenção da saúde do solo (YANG; SIDDIQUE; LIU, 2020). No Brasil, estudos mostram que o uso da terra e as práticas agrícolas provocam alterações na abundância, estrutura, diversidade e atividade das comunidades microbiológicas do solo (FRANCO et al., 2016; MAZZETTO et al., 2016; LAMMEL et al., 2017; LOPES; FERNANDES et al., 2020), modificando, conseqüentemente, as funções desempenhadas pela microbiota no ambiente solo-planta-atmosfera (MEURER et al., 2016). Entre os diversos processos que os microrganismos realizam no solo estão a ciclagem do carbono (C) e de nutrientes, como nitrogênio (N) (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016).

No contexto da agricultura, existe um especial interesse no ciclo do N, visto que o N é um nutriente limitante na produtividade das culturas (GOOD; SHRAWAT; MUENCH, 2004) e os solos agrícolas são importante fonte de óxido nitroso (N_2O) para a atmosfera (GALLOWAY et al., 2004). Globalmente, é estimado que cerca de 10,9 Tg N- N_2O pode ser perdido de superfícies dos solos a cada ano (GALLOWAY et al., 2004). Esta perda ocorre, principalmente, nos processos de nitrificação e desnitrificação (BOUWMAN et al., 2013), onde microrganismos do solo, como as arqueias, as bactérias e os fungos, atuam (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016). Nas regiões tropicais, a capacidade do solo atuar como potencial dreno de N_2O permanece incerta (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013), sendo importante avaliar os possíveis meios para mitigação das emissões em ecossistemas terrestres.

Os processos que regulam o nitrogênio no solo, principalmente aqueles que controlam a entrada e saída de N dos sistema solo-planta são amplamente conhecidos, sendo fundamental para otimizar a eficiência do uso deste elemento pelas plantas e evitar perdas e desperdícios de nitrogênio do ambiente (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992); no entanto há ainda pouco conhecimento sobre o papel dos microrganismos do solo nestes processos.

1.1 Hipótese e objetivos

Sabendo que os microrganismos do solo são os principais responsáveis pela ciclagem do nitrogênio, tem-se como hipótese que as comunidades microbianas tenham suas diversidades reduzidas pela aplicação de fertilizantes na pastagem e na cana-de-açúcar. Além disso, considerando-se que houve um aumento no fluxo de N_2O nas parcelas que receberam fertilizantes nitrogenados (BENTO, 2020), nossa hipótese é que as abundâncias de microrganismos nitrificadores e desnitrificadores sejam mais elevadas nas parcelas que receberam fertilizantes.

Diante do exposto, nosso objetivo foi investigar o papel da comunidade microbiana nos processos biogeoquímicos que regulam a dinâmica do nitrogênio frente às alterações no solo, provocadas pela conversão pastagem-cana-de-açúcar e intensificação de pastagem e cana-de-açúcar. Tendo em vista o considerável avanço em técnicas de sequenciamento genético e a utilidade desse conhecimento, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e a riqueza da comunidade microbiana e como essas características são modificadas pelo uso do solo e manejo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos mais importante para a vida na Terra. O N é essencial para a constituição de moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, *i.e.* ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico, conhecidos como DNA e RNA, respectivamente (HEATHER et al., 2016). A quantidade total de N na atmosfera, no solo e no meio aquático é de aproximadamente 4×10^{21} g (GALLOWAY et al., 2003). O dinitrogênio (N_2) é a principal forma encontrada no planeta, compondo 78% da atmosfera. No entanto, o N_2 é um gás quimicamente inerte e, portanto, indisponível para uso direto de plantas e da maioria dos organismos (GALLOWAY et al., 2003; BURFORD; FRYZUK, 2017).

Nos solos, o nitrogênio está presente sobretudo em formas orgânicas (mais de 90%) e, uma pequena fração (menos de 0,1%) do N total encontra-se em formas inorgânicas e disponíveis, incluindo os íons amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (STEVENSON, 1982). Os compostos das formas inorgânicas são produtos de transformações biológicas mediadas, principalmente, por fungos, arqueias e bactérias do solo (HAYATSU et al., 2008; LAUGHLIN et al., 2008). Entre as principais transformações que ocorrem no solo, podemos citar a amonificação, a nitrificação, a desnitrificação e a fixação biológica do N, processos estes associados a genes promotores em microrganismos diversificados (ALBRIGHT et al., 2019). Sabe-se que tais transformações são complexas e influenciadas por características físicas e químicas do solo (COOKSON et al., 2006).

As vias naturais de entrada de nitrogênio no ambiente ocorrem primordialmente, pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) diretamente a amônia (NH_3), forma assimilável para plantas e organismos (GALLOWAY et al., 2003). Outra via de fixação do N é por descargas elétricas, somando menos de 3% do N fixado naturalmente (FOWLER et al., 2013). O processo de FBN envolve a presença e a atividade do complexo enzimático denominado nitrogenase, altamente preservado nos organismos fixadores (MONTEIRO et al., 2008). Entre os organismos fixadores estão bactérias que fixam N por simbiose incluindo cianobactérias e gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (BERGMAN et al., 1993; KAHINDI et al., 1997; HAYAT et al., 2010).

Entre as bactérias de vida livre no solo, que mantém relação associativa com plantas, estão espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (HAYAT et al., 2010). Por serem poucos os organismos que possuem essa capacidade de fixar o nitrogênio, a FBN é considerada um dos mais importantes processos na ciclagem do N (NELSON; MARTINY; MARTINY, 2016). A fixação biológica de N ocorre em ambientes terrestres e marinhos, sendo que os ambientes marinhos provêm dois terços do N fixado da atmosfera, enquanto um terço provém da fixação biológica que ocorre em ambientes terrestres (FOWLER et al., 2013).

O processo de mineralização é de grande importância para o ambiente, pois disponibiliza as formas orgânicas e prevalentes de nitrogênio do solo na forma de NH_4^+ . Quando as formas de N inorgânicas são absorvidas como nutriente pelas plantas ou são incorporadas por microrganismos do solo, o N é convertido em formas orgânicas, e estas conversões compreendem a imobilização do N, processo oposto ao da mineralização (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). O amônio, que não é absorvido por organismos, pode sofrer oxidação para N-nitrito (NO_2^-), em processo mediado por arqueias e bactérias oxidantes de amônio (AOA e AOB, respectivamente), em seguida o N-nitrito é imediatamente transformado em N-nitrato (NO_3^-), processo realizado por bactérias oxidantes de nitrito (OUYANG et al., 2016). Estas transformações consistem no processo denominado nitrificação, que ocorre em duas etapas, como descrito.

A nitrificação é um processo mediado por baixa diversidade de microrganismos do solo, e ocorre apenas diante de condições ambientais específicas, tais como, presença de oxigênio, pH e temperatura ótimos (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016). De maneira distinta da nitrificação, a desnitrificação é um processo anaeróbico e de retorno do N à atmosfera, que pode ser descrito como a redução bioquímica de formas oxidadas de N, tal como o nitrato (NO_3^-), a formas gasosas, como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), e N_2 (WANG et al., 2018). Os organismos responsáveis por esses processos são mais diversos e pertencem aos grupos de bactérias, arqueias e eucariotos, que na ausência de O_2 utilizam N-nitrato, N-nitrito, óxido nítrico ou óxido nitroso, como aceptores finais de elétrons durante o processo de respiração anaeróbia (JONES et al., 2013; MAEDA et al., 2015).

As etapas redutoras da desnitrificação envolvem enzimas que catalisam a redução de nitrato para nitrito; a redução do NO_2^- à NO; a redução do NO à N_2O , sendo que apenas uma enzima converte N_2O a N_2 , no caso a enzima óxido nitroso-redutase (JONES et al., 2013). As fontes de emissão de óxidos de N é de especial importância, pois são considerados precursores de ozônio (O_3) troposférico; além disso o N_2O é um potente gás do efeito estufa

(GALLOWAY et al., 2008; SOUZA et al., 2018). Outros processos também são relevantes na transformação do N em solos, e embora pouco conhecidos, apresentam importância para o manejo do nitrogênio em sistemas agrícolas. Como por exemplo, a nitrificação desnitrificadora (ou nitrificação-desnitrificante), que é a combinação dos processos de nitrificação e desnitrificação por organismos diferentes (desnitrificação imediata *in situ*), e ocorre quando o nitrito resultante da nitrificação sofre redução e não oxidação a NO_3^- (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013). Essa via é intermediada por bactérias desnitrificadoras e ocorre quando o ambiente apresenta baixa disponibilidade de O_2 (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016).

Ainda sobre condições de ausência ou baixa disponibilidade de oxigênio, o íon amônio pode sofrer oxidação anaeróbica a N_2 , por bactérias que utilizam o nitrito como receptor final de elétrons. Tal processo é conhecido por anammox ou simplesmente oxidação anaeróbica do NH_4^+ , que acoplada com a redução do nitrito, resulta em N_2 (YANG et al., 2015). Além disso, ocorrem a decomposição química da hidroxilamina (NH_2OH , que é produto intermediário na conversão de amônio à NO_2^-) durante a nitrificação; a decomposição abiótica do nitrato de amônio na presença de luz e umidade; a desnitrificação conduzida por organismos capazes de utilizar óxidos de nitrogênio (como fontes alternativas de aceptores de elétrons na ausência de O_2); a co-denitrificação de compostos orgânicos nitrogenados (TATSOU et al., 1992); e por fim, a amonificação do nitrato ou redução dissimilatória do nitrato à amônio (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013; RÜTTING et al., 2011).

Embora tais vias não sejam tão comuns, estudos atuais têm mostrado que estes processos exercem contribuição significativa nas emissões e consumo de N no ambiente, sobretudo em áreas de cultivo agrícola (RÜTTING et al., 2011). E a melhor compreensão dessas vias pode auxiliar na tomada de medidas e práticas que melhorem a eficiência e produtividade sustentável das culturas (YANG et al., 2015; HINK; NICOL; PROSSER, 2017).

2.2 Influências antropogênicas no ciclo do nitrogênio

Atualmente, as atividades humanas têm alterado a distribuição e a dinâmica das diferentes formas de nitrogênio, resultando em acúmulo de nitrogênio reativo (Nr) no ambiente, que por sua vez provoca alterações importantes em ecossistemas terrestres e aquáticos (GALLOWAY et al., 2003; GALLOWAY et al., 2008). Evidências científicas das alterações substanciais no ciclo do N causadas por ações antrópicas são indicadas há mais de duas décadas (VITOUSEK et al., 1997). Atualmente, o uso de fertilizantes nitrogenados e a queima de combustíveis fósseis são os principais processos que transformam

N_2 atmosférico, inerte, em formas biologicamente disponíveis (N_r) no ambiente (FOWLER et al., 2013). No primeiro processo ocorre a redução do nitrogênio atmosférico pelo processo de fixação sintética da amônia (processo Haber-Bosch) e pelo cultivo de plantas que através da simbiose com bactérias fixam NH_3 . Por outro lado, na queima de combustíveis fósseis, ou na combustão da biomassa para gerar energia, o nitrogênio é oxidado (FOWLER et al., 2013).

As formas de N solúveis e biologicamente disponíveis para uso de plantas e organismo são escassas nos ambientes naturais, portanto, o N é considerado um elemento limitante ao crescimento das plantas (GOOD; SHRAWAT; MUENCH, 2004; GALLOWAY et al., 2008). Dessa forma, as culturas agrícolas exigem uma demanda por N que é suprida pela adição e correção de adubos químicos ou orgânicos, que contenham em sua composição o N em suas combinações amoniacais, nítricas ou orgânicas.

A amônia é a substância base principal para a síntese de fertilizante nitrogenado. Os precursores da síntese artificial de NH_3 foram os químicos Fritz Haber (1868-1934) e Carls Bosh (1874-1940), ambos de nacionalidade alemã. Motivo pelo qual a reação química de síntese de amoníaco passou a ser chamada de processo Haber-Bosh, em homenagem aos responsáveis por essa descoberta. Em meados de 1910, Fritz Haber, reproduziu o processo de natural de fixação biológica de N em laboratório, em que o nitrogênio reage com o hidrogênio na presença de um reator submetido a condições de alta pressão (200 atm) e temperatura ($400^\circ C$). Em meados de 1913, a experiência laboratorial desenvolvida por Haber foi expandida em escala industrial por Carls Bosh (1874-1940), com a produção e comercialização do primeiro fertilizante nitrogenado mineral sintetizado pelo homem, o sulfato de amônia.

Com esse advento, a humanidade não se viu mais dependente da fixação biológica natural de nitrogênio, e então iniciou-se a fabricação de fertilizantes nitrogenados ao redor do mundo. A descoberta do processo Haber-Bosch propiciou benefícios imensuráveis para a vida e bem-estar da população humana (SMIL, 1999). Em contrapartida, a descoberta e a posterior industrialização da síntese de amônia culminou em um enriquecimento de N_r no planeta (RAZON, 2018). Atualmente, foi estimado que 210 Tg de N são fixados por ano em decorrência da transformação do N atmosférico em N reativo, principalmente por meio do processo Haber-Bosh e pelas culturas agrícolas que fixam nitrogênio (FOWLER et al., 2013).

Globalmente, é estimado cerca de 11 Tg $N-N_2O$ são emitidos da superfície dos solos a cada ano (GALLOWAY et al., 2004), montante equivalente a cerca de 70% das emissões globais de N_2O (BOUWMAN et al., 2013). O uso de fertilizantes nitrogenados é uma das principais fontes diretas de emissão de N_2O (local onde o fertilizante é aplicado), e, portanto, o uso eficiente desses produtos é fundamental no controle dos fluxos de

N₂O (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013; SHCHERBAK; MILLAR; ROBERTSON, 2014). Apesar disso, as emissões de N₂O não são provenientes apenas das áreas que aplicam fertilizante nitrogenado. A alta mobilidade das formas de nitrogênio reativo, os fenômenos de volatilização, lixiviação, e erosão do solo contribuem para a elevação das emissões de N₂O devido ao acúmulo de Nr provenientes das atividades antropogênicas, com consequentes efeitos no ambiente (TIAN et al., 2019).

O excesso de Nr no ambiente também é responsável pelo decréscimo do pH da solução do solo, que leva à perda de cátions básicos por lixiviação e diminuição da fertilidade do solo (VITOUSEK et al., 1997). O acúmulo de Nr é considerado um dos principais problemas relacionados à poluição de ambientes costeiros devido à eutrofização, seguida de redução dos níveis de oxigênio nesses ambientes, e consequente degradação destes ecossistemas (HOWARTH, 2008). O nitrogênio, por ser um nutriente essencial, exerce importante efeito sobre a biodiversidade, favorecendo espécies que melhor se adaptam à maiores concentrações desse nutriente (VITOUSEK et al., 1997). Finalmente, o acúmulo de Nr no ambiente traz prejuízos graves para a saúde humana. O aumento das emissões de compostos como óxido nítrico e amônia causam doenças respiratórias e cardíacas (ANEJA et al., 2009; SUTTON et al., 2011).

Nos sistemas agrícolas, o principal processo de fixação de N é aquele proveniente da simbiose entre plantas leguminosas e bactérias conhecidas como rizóbios (ordem *Rhizobiales*). A soja (*Glycine max*) é considerada a principal cultura leguminosa capaz de fixar N biologicamente, sem haver a necessidade de uso de fertilizantes nitrogenados (CASSOL et al., 2020). A produção da soja representa 50% da área total cultivada com leguminosas, e é responsável por fixar 16,4 Tg N anualmente, o que equivale a quase 80% de todo nitrogênio fixado pelas leguminosas (HERRIDGE et al., 2008). Apesar de associações simbióticas com rizóbios não serem naturais com plantas não-leguminosas, trabalhos mostram que culturas como arroz, milho, cana-de-açúcar, e gramíneas são capazes de fixar N₂ por meio de relações menos especializadas com microrganismos de vida livre ou associados às plantas (HERRIDGE et al., 2008; YONEYAMA et al., 2019).

Estratégias de redução da quantidade de Nr criado anualmente no planeta incluem o controle das emissões dos óxidos de nitrogênio (NO_x) provenientes da combustão de combustíveis fósseis, a implementação de tratamentos de esgotos nos grandes centros urbano e o aumento da eficiência das culturas agrícolas na absorção e uso do N disponível (GALLOWAY et al., 2008; BORTOLI et al., 2012; LOURENÇO et al., 2018). Considerando que os microrganismos do solo são os principais agentes das transformações do

N na interface solo-planta-atmosfera, compreender a ecologia dos microrganismos responsáveis pelos principais processos relacionados à perda do N no sistema é de grande importância para o avanço do uso eficiente do N na agricultura (CASSMAN et al., 2019; RIGOTTO et al., 2020).

2.3 O papel da comunidade microbiana do solo no ciclo do N

O solo, considerado um dos principais compartimentos da biosfera, possui heterogeneidade de características físicas e químicas, e contempla grande diversidade biológica (FIERER; JACKSON, 2006). Estima-se que em um grama de solo existam de 10^7 a 10^9 células vivas, o que representa milhares de espécies de microrganismos habitando esse meio (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016). A grande diversidade de organismos que habita o solo controla as transformações dos elementos químicos e transferência de energia e nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os microrganismos em interação entre si e com os outros compartimentos de plantas e atmosfera, tornam os solos altamente dinâmicos no tempo e no espaço, com fundamental papel na preservação do equilíbrio ecológico (BRADY; WEIL, 2013).

Os microrganismos do solo e as interações que ocorrem entre si e com os compartimentos planta e atmosfera atuam na ciclagem do carbono, fósforo, nitrogênio, entre outros elementos, que, quando em equilíbrio ecológico, favorecem a fertilidade do solo e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Tendo em vista a importância do N para os sistemas naturais e agrícolas, o conhecimento da composição da comunidade microbiana e dos processos que regulam a distribuição das formas de N no solo tem potencial para subsidiar ações mitigadoras sobre as perdas deste nutriente no ambiente (CASSMAN et al., 2019). A nova forma de explorar abundância e composição microbianas por meio de sequências de DNA esclarece como as comunidades microbianas atuam no regulamento dos diversos processos biogeoquímicos e como alterações nessas comunidades afetam as atividades em que estão envolvidas (NELSON; MARTINY; MARTINY, 2016; WANG et al., 2018).

Enquanto por muito tempo as técnicas denominadas como “dependentes de cultivo” permitiram acessar informações de menos de 10% de toda a comunidade microbiana do solo passível de ser cultivada (TORSVIK; SØRHEIM; GOKSØYR, 1996), avanços dos métodos e técnicas moleculares permitiram investigar com mais detalhes e precisão a diversidade e a funcionalidade da microbiota do solo (RAES, 2017). As técnicas independentes de cultivo,

baseadas nas análises de ácidos nucleicos, têm sido desenvolvidas e aplicadas com sucesso, visando investigar organismos responsáveis por processos de interesse, como aqueles com potencial para controlar a perda e aumentar a eficiência da assimilação do N no solo (ALBRIGHT et al., 2019). Este tipo de investigação contribui para o esclarecimento do papel das comunidades microbianas na regulação e controle de importantes processos, tais como a perda e assimilação de N no ambiente (REGAN et al., 2017).

A fixação biológica do N, a amonificação, a nitrificação e a desnitrificação são consideradas as transformações mais relevantes que ocorrem no solo. Os microrganismos com capacidade de fixar N_2 são chamados de diazotróficos. Estes organismos pertencem aos domínios *Bacteria* e *Archaea* e sua maioria é encontrada em vida livre no solo e em outros habitats (LEIGH, 2000; BOMFIM et al., 2020). A alta eficiência da associação simbiótica entre rizóbios e leguminosas é amplamente conhecida como processo chave para a sustentabilidade agrícola (DÖBEREINER et al., 1966). Devido ao interesse no uso eficiente do N pelas plantas, estudos avançaram para compreender as associações entre organismos diazotróficos e não leguminosas a fim de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos na agricultura (MAHMUD et al., 2020). Atualmente, sabe-se que plantas como arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar são capazes de realizar associações com diferentes espécies de bactérias diazotróficas (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016). Por exemplo, organismos do gênero *Beijerinckia sp.*, que habitam as raízes de cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1961), carregam o gene *nifH* e fixam nitrogênio de maneira endofítica em vida livre (MAHMUD et al., 2020).

Os microrganismos do solo também são os principais responsáveis pela mineralização das formas de N orgânicas do solo. Por meio deste processo de amonificação, os organismos heterotróficos, aeróbios e anaeróbios obtêm energia em distintas condições ambientais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A quebra do N orgânico ocorre por ação de enzimas extracelulares e os compostos produzidos podem ser diretamente utilizados ou transformados em NH_3 ou NH_4^+ . Nos solos agrícolas, enquanto em pH elevado ocorre a predominância da forma amoniacal NH_3 , que pode ser perdida para a atmosfera, o processo de mineralização pelos microrganismos é favorecido pela faixa de pH neutro (entre 6 e 7) (PROSSER et al., 2020). A amonificação é considerada um processo redundante pela grande diversidade de microrganismos amonificadores (CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016), e pelas vias possíveis de transformação, aproximadamente 280 vias de amonificação por bactérias (NELSON; MARTINY; MARTINY, 2016). A redundância funcional na amonificação garante a resiliência deste processo no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O amônio em excesso no solo, que não foi assimilado como nutriente ou absorvido como biomassa microbiana, é oxidado por microrganismos quimioautotróficos que utilizam a energia produzida na oxidação para síntese celular no processo de nitrificação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; HAYATSU et al., 2008). Atualmente, é conhecido que além das bactérias oxidadoras de amônia, arqueias e fungos também produzem NO_3^- no solo (SCHLEPER; NICOL, 2010). Entre as bactérias mais estudadas relacionadas às etapas de nitrificação estão organismos dos gêneros *Nitrosomonas sp.* e *Nitrospira sp.*, que convertem amônia em NO_2^- e, o gênero *Nitrobacter sp.*, responsável por transformar NO_2^- em NO_3^- . Foi demonstrado que em solo tropical sob uso agrícola o gênero *Nitrospira sp.* é prevacente entre as bactérias oxidadoras de amônia (LOURENÇO et al., 2018). No solo, a composição e a abundância dos grupos nitrificadores sofrem influência da presença do nitrogênio e de outras propriedades do solo, sendo que a resposta dos microrganismos oxidadores de amônia ao manejo agrícola nem sempre segue o mesmo padrão (STALEY et al., 2018; OUYANG et al., 2016; HALLIN et al., 2009).

Na ausência de oxigênio, os microrganismos podem usar o nitrato como o aceptor final de elétrons durante a respiração anaeróbia. É por meio deste processo, chamado desnitrificação, que formas gasosas de N (N_2O , N_2) retornam à atmosfera por etapas que envolvem enzimas redutases (BERKS et al., 1995; CARDOSO; DINI ANDREOTE, 2016). No solo, a maioria das bactérias desnitrificadoras pertencem ao filo Proteobacteria (HAYATSU et al., 2008). Além de bactérias, arqueias e eucariontes também são capazes de realizar a desnitrificação no ambiente solo (KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2011). A desnitrificação fúngica foi relatada, sobretudo, na ordem Hypocreales, com o gene *nirK* encontrado nos organismos dos gêneros *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, entre outros (MAEDA et al., 2015; XU et al., 2019). Os microrganismos desnitrificantes que possuem o gene *nosZ*, relacionado à enzima óxido nítrico-redutase (Nos), são capazes de converter N_2O à N_2 e assim contribuem com o consumo de N_2O por meio da redução deste gás nos solos (JONES et al., 2013).

Dentre os atributos dos solos, é de conhecimento geral que o compartimento biológico é o mais sensível frente aos efeitos das práticas humanas, portanto, as mudanças no uso da terra, sobretudo para produção agrícola, é um fator que afeta a estrutura e composição das comunidades microbianas dos solos e sua diversidade funcional (FRANCO et al., 2016; LAMMEL et al., 2017). Ao passo que as mudanças do uso da terra e manejo influenciam a estrutura e composição das comunidades microbianas do solo, os processos biogeoquímicos pelos quais são responsáveis também sofrem implicações (STALEY et al., 2018; WANG et al., 2018). Na agricultura, considerar alta diversidade de grupos microbianos que

contribuam para o melhor uso de N pelas plantas e controle de sua perda no solo pode ser uma alternativa de manejo eficiente e sustentável para aumentar a produtividade das culturas (NORTON; OUYANG, 2019). A adoção de estratégias que favoreçam a presença de determinados grupos microbianos no solo contribui para o uso eficiente de fertilizantes e para a mitigação de emissões de N₂O (PROSSER et al., 2020).

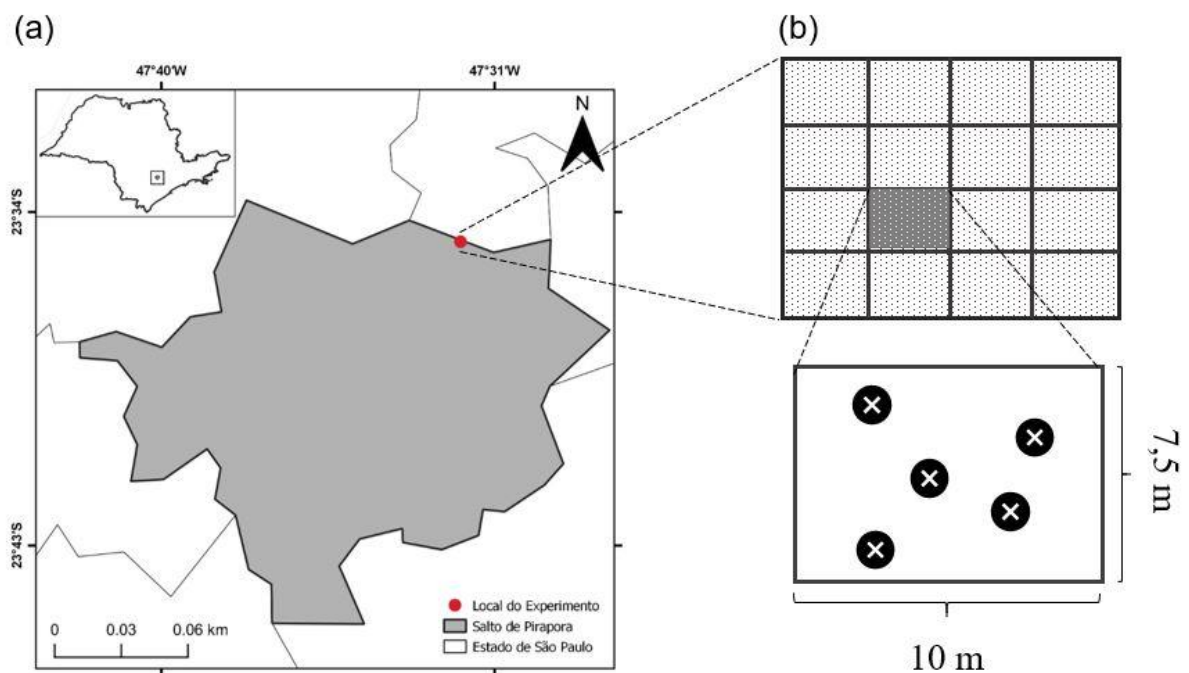
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e desenho experimental

Este estudo foi desenvolvido na fazenda Flores, uma propriedade agrícola localizada no município de Salto de Pirapora, região metropolitana de Sorocaba, no interior do Estado de São Paulo, Brasil. O local encontra-se à latitude $23^{\circ}35' S$, e longitude $47^{\circ}32' W$ (Figura 1a). A região apresenta altitude máxima de 630 m. Segundo a classificação de Köeppen, o clima da região foi classificado como subtropical quente, do tipo Cfa (temperado úmido com verão quente), com temperatura média anual de $21^{\circ}C$ e precipitação média anual de 1.330 mm (Instituto Nacional de Meteorologia, INMET).

A propriedade agrícola, onde o experimento foi implementado, tem mais de sessenta anos de atividade voltada à criação de gado leiteiro e produção de leite. Segundo os proprietários, o histórico da área era de pastagem com sistema extensivo não sendo realizado nenhum tipo de manejo com lotação média atual de uma unidade de animal por hectare ($1 UA ha^{-1}$).

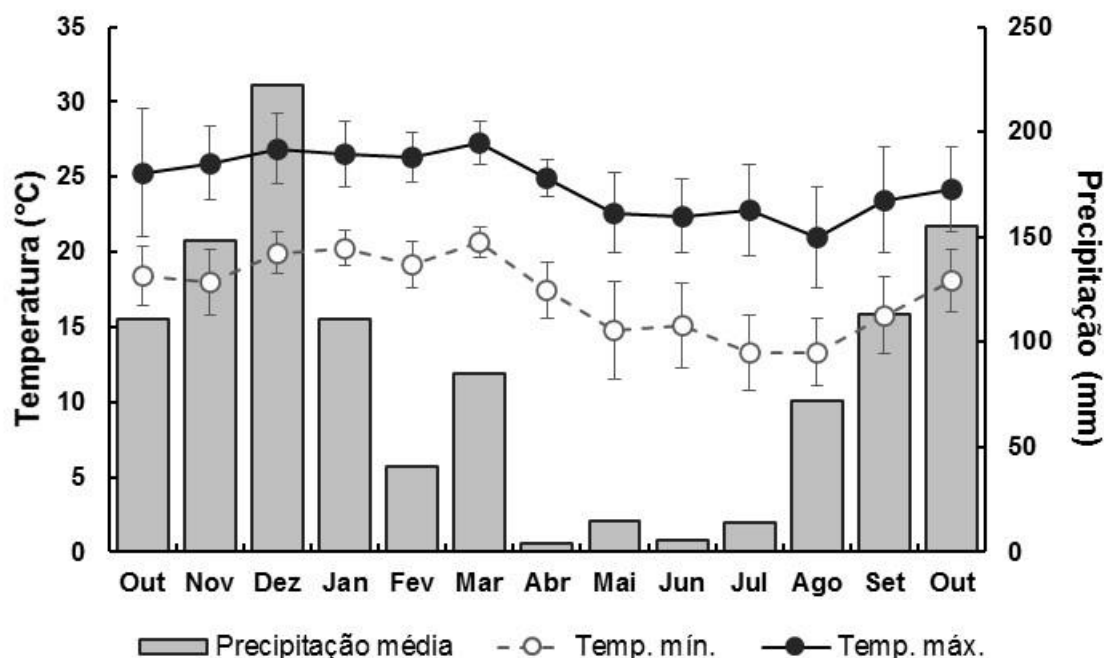
Figura 1 – Localização geográfica da área de estudo e representação do desenho experimental e da estratégia de amostragem no município de Salto de Pirapora (SP), situada na região Sudeste do Estado de São Paulo, Brasil



O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2013), com conteúdo de argila superior à 500 g kg^{-1} . Antes da conversão da pastagem em cana-de-açúcar a densidade da área experimental foi de $1,04 \text{ g cm}^{-3}$ (CAMARGO et al., 2009).

No período de amostragem a precipitação foi de 1.097 mm e a média da temperatura do ar variou entre 17°C e 25°C . Os dados mensais de precipitação e de temperatura máxima e mínima do ar no período em que compreendeu os tempos de amostragens do solo, entre outubro de 2017 e outubro de 2018, foram apresentados na Figura 2.

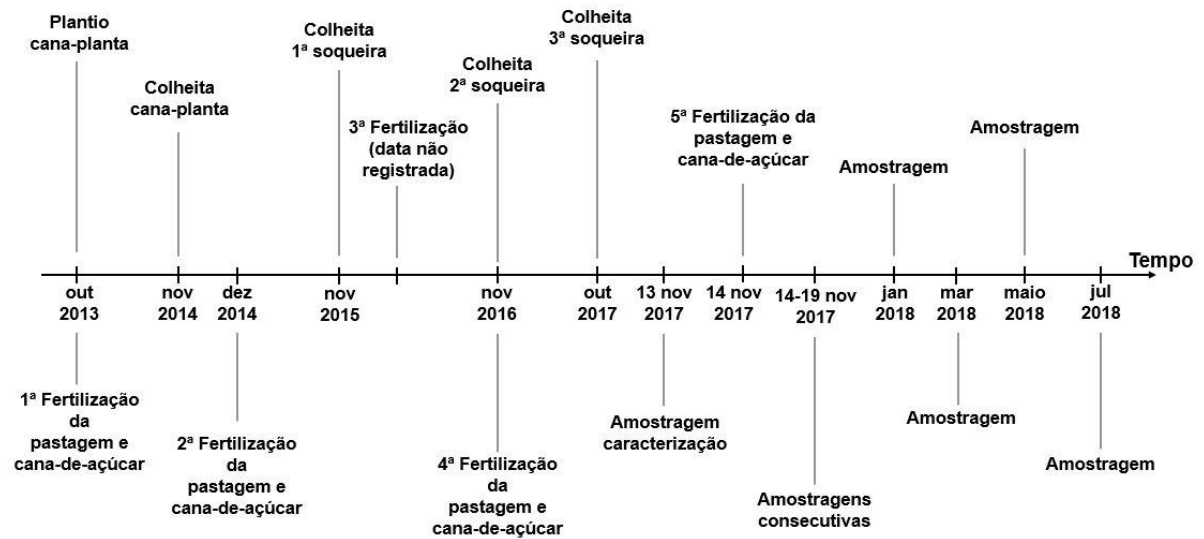
Figura 2 – Dados climatológicos mensais da área de estudo entre outubro de 2017 a outubro de 2018. As linhas representam as médias das temperaturas máxima (escura) e mínima (clara) do ar; e as barras representam a soma mensal da precipitação (INMET, 2017; 2018)



Para o presente estudo foi utilizado o delineamento experimental implementado no ano de 2013 pela Profa. Janaína Braga do Carmo e Msc. Camila Bonfarini Bento, do Departamento de Ciências Ambientais (UFSCar – Sorocaba), onde realizaram pesquisas sobre emissão de gases do efeito estufa ao longo de cinco anos. As amostragens de solo para o presente estudo ocorreram entre novembro de 2017 e julho de 2018, isto é, quatro anos após o estabelecimento das parcelas experimentais e a realização das práticas de manejo com fertilizantes.

As principais atividades de manejo realizadas na área, desde o plantio da cana-planta, assim como os períodos de fertilização e amostragens de solo, voltadas para este estudo, foram apresentados na forma de uma linha do tempo (Figura 3).

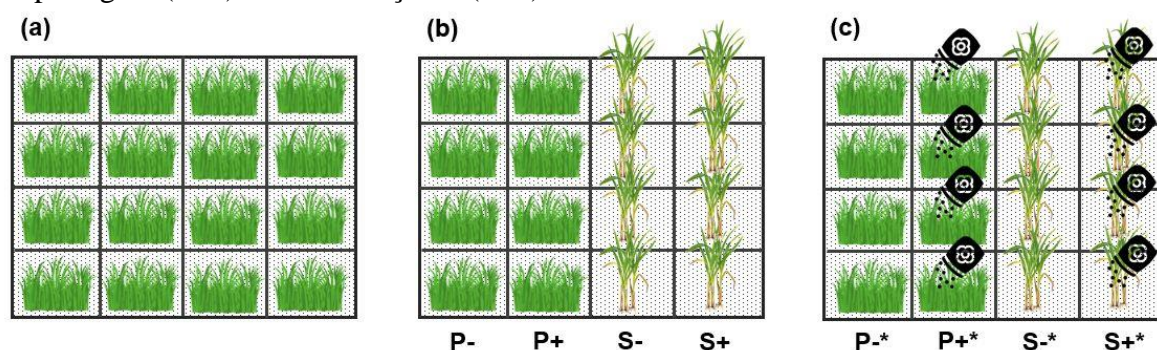
Figura 3 – Linha do tempo contendo informações sobre as principais atividades de manejo realizadas nos anos experimentais e os períodos de amostragens do solo conduzidas para o presente estudo



As amostragens deste estudo compreenderam o período da quarta soqueira da cana-de-açúcar, no ciclo entre os anos de 2017 e 2018, e foram realizadas consecutivamente em todas as parcelas de pastagem e cana-de-açúcar. A amostragem de caracterização, em 13 de novembro de 2017, ocorreu após a colheita da terceira soqueira da cana-de-açúcar e antes da quinta aplicação de fertilizantes na cana-de-açúcar e na pastagem. Após a quinta fertilização, foram realizadas amostragens por seis dias consecutivos, de 14 a 19 de novembro de 2017, e posteriormente nos meses de janeiro, março, maio e julho de 2018, em noventa; cento e trinta e nove; cento e noventa e cinco; e duzentos e cinquenta e oito dias transcorridos da quinta fertilização, respectivamente.

O experimento foi delineado em quatro tratamentos e quatro repetições representando os usos do solo por pastagem extensiva, pastagem intensiva, cana-de-açúcar sem fertilizantes e cana-de-açúcar com fertilizantes (Figura 4). A simulação da conversão de pastagem para cana-de-açúcar foi realizada mediante o preparo do solo para o cultivo de cana-de-açúcar no sistema convencional (Figura 4b), que foi seguido pela aplicação de fertilizantes em quatro parcelas sob cana-de-açúcar e quatro parcelas sob pastagem, como manejo de intensificação do sistema de pastagem e cana-de-açúcar (Figura 4c).

Figura 4 – Esquema representando as parcelas experimentais e seus respectivos usos do solo. (a) Uso do solo com sistema extensivo de pastagem; (b) conversão das parcelas de pastagem para cana-de-açúcar em outubro de 2013; (c) aplicação de fertilizantes minerais nas parcelas de pastagem (P+*) e cana-de-açúcar (S+*)



Os usos do solo consistiram em pastagem extensiva subutilizada, como sendo o tipo mais comum no Brasil, sem adições de fertilizantes orgânicos e minerais e nem correções do pH do solo (P-/P-*); pastagem intensiva, com adição de fertilizantes e correções de solo (P+/P+*); cana-de-açúcar sem aplicação de fertilizantes (S-/S-*); e cana-de-açúcar com aplicação de fertilizantes (S+/S+*). As siglas “P” e “S” representam as abreviações das palavras *pasture* e *sugarcane*, relativas ao uso solo do solo por pastagem ou cana-de-açúcar, respectivamente.

Os sinais que seguem as letras P e S foram indicativos de aplicação “+” ou ausência de aplicação “-” de fertilizantes. As siglas P-, P+, S-, S+ foram usadas para representar as parcelas antes da quinta fertilização (Figura 4b), e as siglas P-*, P+*, S-*, S+* representaram as mesmas parcelas após a quinta fertilização. Em que nas parcelas P-/P-* e S-/S-* não houve nenhum manejo, são as mesmas parcelas amostradas antes e depois da fertilização. Enquanto as parcelas P+/P+* e S+/S+* foram submetidas ao diferente manejo, pois foram fertilizadas (Figura 4c).

Os tratamentos foram replicados em quatro blocos ao acaso, totalizando 16 parcelas experimentais com dimensões de 10 x 7,5 m cada uma (75 m²), onde coletas de solo foram realizadas em amostras compostas em todas as parcelas a cada período amostral. Para as amostras compostas foram misturadas homogeneamente cinco amostras simples coletas na profundidade 0-10 cm da camada de solo por parcela (Figura 1b).

A aplicação de calcário não se fez necessária na área experimental pela concentração de cálcio (Ca) no solo ser maior do que 4 mmol_cdm⁻³ e a saturação por bases acima de 60% (VAN RAIJ et al., 1997). Nas parcelas a serem fertilizadas, a aplicação do fertilizante foi realizada em área total na pastagem intensiva e nas linhas de cultivo na cana-de-açúcar.

Apenas no primeiro ano do experimento houve o pastejo do gado nos tratamentos com pastagem extensiva e intensificada. Nos anos posteriores, que inclui o período de amostragem

deste estudo, não foi considerado o animal nas parcelas de pastagem. Para simular o pastejo do gado, as parcelas com pastagem foram roçadas e o material vegetal retirado da superfície do solo, em um processo realizado mais de uma vez ao ano.

3.2 Manejo de pastagem e cana-de-açúcar

Nas parcelas de pasto, o solo foi preparado e semeado com a espécie *Brachiaria brizanta* (*Brachiaria brizanta* cv. Marandú 80% de germinação e 60,3% de pureza). A intensificação do sistema da pastagem teve como objetivo o aumento da produtividade da forragem por meio do uso de insumos agrícolas. Foram aplicadas fontes minerais de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), as quais foram, respectivamente, nitrato de amônio NH_4NO_3 (32% de N-nitrato), superfosfato simples (19% de P_2O_5) e cloreto de potássio KCl (62% de K_2O). As doses de fertilizantes foram equivalentes à 60 kg ha^{-1} de NH_4NO_3 , 40 kg ha^{-1} de superfosfato simples e 40 kg ha^{-1} de KCl.

A produtividade dos sistemas de pastagem foi estimada em janeiro de 2014 com a produção média de $1,15 \pm 0,69 \text{ t ha}^{-1}$ nas parcelas não fertilizadas, e de $1,27 \pm 0,6 \text{ t ha}^{-1}$ nas parcelas fertilizadas (dados secundários da Dra. Camila Bonfarini Bento).

As parcelas de cana-de-açúcar foram cultivadas de acordo com as práticas convencionais utilizadas na maioria das áreas canavieiras no Estado de São Paulo, sendo utilizada a cultivar RB86-7515, tendo cada parcela cinco linhas de cana-de-açúcar com espaçamento de 1,5 m. O sistema de colheita da cana-de-açúcar adotado foi do tipo cana-crua, com colheita manual e sem queima. Para o controle de plantas daninhas nas entrelinhas de cana-de-açúcar, herbicidas foram aplicados após o plantio e germinação da cana-de-açúcar. Foram aplicados dois tipos de herbicidas: Volcane[®] e Diuron[®] nas dosagens de 10 mL L^{-1} e $6,5 \text{ mL L}^{-1}$, respectivamente. Em seguida ao plantio, as parcelas receberam a aplicação de fertilizantes. A aplicação de N na cana-de-açúcar foi similar à da pastagem, com 60 kg ha^{-1} de NH_4NO_3 , 140 kg ha^{-1} de superfosfato simples, e 120 kg ha^{-1} de KCl.

No primeiro ciclo de cultivo da cana-de-açúcar, entre 2013 e 2014, a produtividade nas parcelas que não receberam aplicação de fertilizantes foi de $65,53 \pm 18,78 \text{ t ha}^{-1}$, com média de $71,67 \pm 11,79 \text{ colmos ha}^{-1}$, enquanto as parcelas de cana-de-açúcar fertilizadas apresentaram produtividade de $66,75 \pm 26,95 \text{ t ha}^{-1}$ e $81,25 \pm 18,97 \text{ colmos ha}^{-1}$. A partir do segundo ciclo da cana-de-açúcar (primeira soqueira), as doses de fertilizantes foram as seguintes: 60 kg ha^{-1} de NH_4NO_3 , 40 kg ha^{-1} de superfosfato simples e 40 kg ha^{-1} de KCl na pastagem; e 120 kg ha^{-1} de NH_4NO_3 , 30 kg ha^{-1} de superfosfato simples e 120 kg ha^{-1} de KCl na cana-

de-açúcar. Entre os anos de 2017 e 2018, a cana-de-açúcar apresentou produção de $64,01 \pm 10,56 \text{ t ha}^{-1}$ e $68,75 \pm 7,5 \text{ colmos ha}^{-1}$ nas parcelas sem fertilizantes e, $72,1 \pm 20,06 \text{ t ha}^{-1}$ e $79,59 \pm 11,66 \text{ colmos ha}^{-1}$ nas parcelas fertilizadas (dados secundários da Dra. Camila Bonfarini Bento).

Os principais manejos realizados na área experimental entre 2013 e 2018 estão descritos na Tabela 1. A primeira colheita da cana foi em outubro de 2014, feita em seguida uma nova adubação. Nos anos seguintes, (i.e. 2015, 2016, 2017) as colheitas foram feitas no mês de novembro, com posterior aplicação de fertilizante e herbicida na cana-de-açúcar, seguindo as mesmas doses iniciais.

Tabela 1 - Sequência das principais atividades de manejo realizadas para a instalação e manutenção do experimento

Ciclo	Manejo			
	P-*	P+*	S-*	S+*
2013-2014	Roçagem para simular pastejo	Roçagem para simular pastejo Aplicação de fertilizante	Plantio cana-planta Aplicação de herbicida	Plantio cana-planta Aplicação de herbicida Aplicação de fertilizante
2014-2015	Roçagem para simular pastejo	Roçagem para simular pastejo Aplicação de fertilizante	Colheita cana-planta Aplicação de herbicida	Colheita cana-planta Aplicação de herbicida Aplicação de fertilizante
2015-2016	Roçagem para simular pastejo	Roçagem para simular pastejo Aplicação de fertilizante	Colheita 1 ^a soqueira Aplicação de herbicida	Colheita 1 ^a soqueira Aplicação de herbicida Aplicação de fertilizante
2016-2017	Roçagem para simular pastejo	Roçagem para simular pastejo Aplicação de fertilizante	Colheita 2 ^a soqueira Aplicação de herbicida	Colheita 2 ^a soqueira Aplicação de herbicida Aplicação de fertilizante
2017-2018	Roçagem para simular pastejo	Roçagem para simular pastejo Aplicação de fertilizante	Colheita 3 ^a soqueira Aplicação de herbicida	Colheita 3 ^a soqueira Aplicação de herbicida Aplicação de fertilizante

3.3 Amostragem do solo

As coletas de solo foram feitas superficialmente, com o auxílio de um tubo de PVC com 5 cm de diâmetro previamente esterilizado, na profundidade 0-10 cm, após remoção das camadas de deposição de restos vegetais. Em novembro de 2017, amostras de solo foram coletadas previamente à aplicação dos fertilizantes para análise de fertilidade e textura na profundidade de coleta (Tabela 2).

Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas dos solos amostrados nas parcelas experimentais da área de estudo na camada 0-10 cm

	pH (CaCl ₂)	M.O. (g dm ⁻³)	C:N	H+Al (mmol _c dm ⁻³)	CTC	SB	V (%)	Argila	Areia (g kg ⁻¹)	Silte
P-	6,1	37,3	14,7	11,5	180,6	169,1	92,3	509,8	370,8	120,0
P+	6,2	37,8	14,8	13,8	146,3	132,5	86,0	523,8	347,5	129,5
S-	6,3	35,8	13,6	13,0	107,8	94,8	87,3	581,5	215,8	203,0
S+	5,7	37,0	13,5	16,5	102,5	86,0	83,0	589,3	213,8	197,0

Nota: M.O. = matéria orgânica do solo; H + Al = acidez potencial; CTC = capacidade de troca catiônica; SB = soma de bases; V = saturação por bases.

Posteriormente à coleta de caracterização, foram realizadas amostragens de solo, na profundidade 0-10 cm, ao longo de 6 dias consecutivos em todas as parcelas do experimento. Em seguida a essa coleta intensiva, foram realizadas amostragens nos meses de janeiro, março, maio e julho do ano de 2018. Os solos foram coletados em cinco locais distintos dentro de cada parcela seguindo uma amostragem aleatória em “zigue-zague”, conforme ilustrado na Figura 2.

As amostras de solo foram revolvidas para homogeneização, e permaneceram por 24 horas no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, foram separadas alíquotas de 50 g para as análises moleculares e, imediatamente congeladas no freezer à -20° C; e alíquotas de 10 g para análises de amônio e nitrato, que foram mantidas em geladeira até encaminhamento para o Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas, da ESALQ.

As alíquotas de solo para as determinações de carbono e nitrogênio total foram secas à 60° C por quatro dias. Quando secas, as amostras tiveram os agregados desmanchados, e foram homogeneizadas, quarteadas, maceradas, peneiradas e todos os materiais residuais vegetais ou animais foram removidos com pinça.

3.4 Caracterização química do solo

As análises físicas e químicas dos solos foram realizadas no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” usando os métodos padrões. A concentração total de argila e das frações de areia e silte foram determinadas pelo método densímetro. A determinação da umidade do solo foi realizada por secagem em estufa e passagem, e a unidade foi expressa em porcentagem.

O pH foi determinado em CaCl_2 a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. O fósforo (P) foi determinado por método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons, a determinação do enxofre (S) foi por turbidimetria e extração com fosfato de cálcio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O potássio (K) foi extraído com resina trocadora de íons e sua concentração determinada em espectrofotômetro de emissão atômica. Cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos com resina trocadora de íons e suas concentrações determinadas em espectrofotômetro de absorção atômica. O alumínio trocável (Al) foi determinado por método titulométrico extraído com cloreto de potássio (1 mol L^{-1}) e a acidez potencial (H+Al) foi extraída com tampão SMP. As formas de nitrogênio inorgânico (NH_4^+ e NO_3^-) foram extraídas pelo método de destilação à vapor (BREMNER, 1965).

Para determinações das concentrações de C e N uma pequena quantidade de cada amostra seca e preparada foi pesada e inserida em cápsula de estanho para análise por combustão a seco no analisador elementar (Carlo Erba modelo 1110, Milão, Itália) acoplado ao espectrômetro de massa (IRMS Delta Plus; Finningan, CA, US). Os dados de caracterização química do solo juntamente com os dados de umidade (U), representada em porcentagem, nas amostragens transcorridas da adubação foram descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios de concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), nitrogênio total (N), fósforo (P), enxofre (S), pH (CaCl₂), matéria orgânica do solo (M.O.), carbono total (C) e umidade (U) do solo sob pastagem subutilizada (P-*), pastagem intensiva (P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+*), na camada de 0-10 cm em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 90, 139, 195 e 258 dias transcorridos da aplicação de adubo nas parcelas P+* e S+*. Os valores apresentados são as médias ($n = 4$) e o desvio-padrão das médias (continua)

	Ca	Mg (mmol _c dm ⁻³)	K	N (%)	P (mg dm ⁻³)	S	pH	M.O. (g dm ⁻³)	C (%)	U
1 dia após adubação										
P-*	144,00 (66,58)	20,50 (7,42)	1,35 (0,39)	0,14 (0,02)	10,25 (0,96)	6,18 (0,55)	6,40 (0,22)	30,75 (8,50)	2,08 (0,35)	25,34 (2,02)
P+*	111,00 (67,15)	14,75 (6,95)	1,30 (0,24)	0,16 (0,03)	8,50 (1,29)	5,90 (0,00)	6,10 (0,47)	37,25 (8,90)	2,27 (0,35)	26,15 (3,21)
S-*	69,25 (8,42)	14,00 (2,83)	1,00 (0,14)	0,16 (0,02)	13,50 (5,26)	8,70 (4,32)	5,83 (0,29)	35,50 (1,29)	2,27 (0,33)	28,94 (7,49)
S+*	52,50 (11,03)	11,00 (1,41)	1,65 (0,37)	0,16 (0,01)	11,50 (1,73)	8,50 (1,73)	5,80 (0,14)	37,25 (1,89)	2,25 (0,13)	26,71 (3,02)
2 dias após adubação										
P-*	95,75 (45,08)	15,75 (8,88)	1,05 (0,17)	0,15 (0,03)	10,25 (0,96)	6,18 (0,55)	6,20 (0,24)	34,25 (5,56)	2,36 (0,45)	28,70 (3,52)
P+*	92,00 (69,76)	19,75 (15,90)	1,48 (0,35)	0,16 (0,03)	13,25 (2,06)	8,00 (0,82)	6,03 (0,35)	34,50 (10,47)	2,34 (0,49)	26,49 (6,54)
S-*	68,00 (14,40)	13,75 (2,63)	0,95 (0,17)	0,15 (0,01)	13,00 (2,83)	5,90 (0,00)	6,35 (0,13)	37,00 (1,41)	2,16 (0,09)	27,13 (1,74)
S+*	48,75 (8,54)	9,50 (2,38)	1,68 (0,33)	0,15 (0,01)	12,00 (2,16)	6,93 (2,05)	5,76 (0,33)	35,00 (2,00)	2,10 (0,12)	26,35 (0,89)

Tabela 3 - Valores médios de concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), nitrogênio total (N), fósforo (P), enxofre (S), pH (CaCl₂), matéria orgânica do solo (M.O.), carbono total (C) e umidade (U) ... (continuação)

3 dias após adubação										
P-*	119,75 (72,37)	23,75 (19,62)	1,30 (0,14)	0,14 (0,04)	12,75 (4,65)	7,20 (1,56)	6,40 (0,18)	34,50 (10,88)	2,10 (0,63)	20,92 (3,17)
P+*	91,00 (44,03)	15,25 (5,06)	1,65 (0,54)	0,14 (0,04)	14,75 (1,26)	6,43 (1,05)	5,90 (0,41)	31,50 (13,63)	2,08 (0,48)	22,24 (5,79)
S-*	52,00 (11,11)	11,25 (1,71)	1,00 (0,34)	0,15 (0,01)	11,25 (3,30)	5,90 (0,00)	6,10 (0,12)	35,25 (4,65)	2,05 (0,05)	25,37 (2,30)
S+*	48,00 (15,12)	11,00 (3,27)	1,98 (0,50)	0,16 (0,01)	13,75 (3,78)	6,95 (1,21)	5,80 (0,28)	35,50 (1,73)	2,09 (0,03)	26,18 (0,32)
4 dias após adubação										
P-*	70,50 (15,33)	13,25 (2,87)	1,28 (0,17)	0,15 (0,03)	12,00 (0,00)	6,18 (0,55)	6,33 (0,22)	36,75 (7,76)	2,20 (0,33)	28,76 (1,55)
P+*	80,75 (51,91)	17,00 (8,83)	1,80 (0,18)	0,15 (0,04)	13,75 (2,75)	7,73 (1,54)	6,03 (0,41)	34,50 (18,06)	2,23 (0,61)	27,17 (5,73)
S-*	57,50 (16,03)	14,75 (3,77)	0,90 (0,08)	0,15 (0,01)	12,50 (2,89)	6,70 (1,01)	6,25 (0,19)	35,75 (0,50)	2,14 (0,08)	28,89 (2,02)
S+*	83,50 (90,67)	20,75 (20,90)	2,63 (1,25)	0,17 (0,01)	13,75 (1,26)	7,22 (1,00)	5,60 (0,34)	38,00 (3,56)	2,20 (0,13)	31,15 (0,38)
5 dias após adubação										
P-*	138,25 (64,47)	26,25 (18,2)8	1,15 (0,06)	0,15 (0,01)	14,25 (4,72)	5,90 (0,00)	6,25 (0,31)	33,00 (3,56)	2,17 (0,21)	30,26 (2,21)
P+*	95,25 (78,81)	17,75 (8,42)	2,45 (0,82)	0,15 (0,04)	20,00 (6,48)	7,70 (2,11)	6,15 (0,48)	37,50 (12,04)	2,16 (0,47)	28,40 (2,82)
S-*	60,25 (9,54)	16,00 (2,82)	1,20 (0,19)	0,15 (0,01)	16,00 (3,27)	8,20 (3,34)	6,43 (0,15)	38,50 (1,29)	2,10 (0,02)	28,30 (1,13)
S+*	47,75 (12,53)	14,50 (5,20)	2,00 (0,49)	0,15 (0,01)	14,50 (2,08)	10,00 (4,00)	5,85 (0,26)	37,75 (2,06)	2,15 (0,07)	29,96 (2,56)

Tabela 3 - Valores médios de concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), nitrogênio total (N), fósforo (P), enxofre (S), pH (CaCl₂), matéria orgânica do solo (M.O.), carbono total (C) e umidade (U) ... (continuação)

	Ca	Mg (mmol _c dm ⁻³)	K	N (%)	P (mg dm ⁻³)	S	pH	M.O. (g dm ⁻³)	C (%)	U
6 dias após adubação										
P-*	124,50 (48,18)	20,00 (5,16)	1,58 (0,37)	0,15 (0,01)	14,25 (4,03)	6,43 (1,05)	6,23 (0,31)	38,25 (4,92)	2,18 (0,24)	30,17 (1,83)
P+*	92,00 a (74,89)	14,75 (5,50)	1,93 (0,39)	0,15 (0,04)	20,50 (7,14)	8,20 (3,90)	6,10 (0,42)	37,00 (12,06)	2,19 (0,66)	30,19 (5,80)
S-*	59,75 (4,27)	14,50 (1,91)	1,08 (0,17)	0,15 (0,01)	17,25 (4,27)	6,70 (1,01)	6,48 (0,05)	37,00 (2,58)	2,18 (0,16)	30,05 (1,36)
S+*	30,00 (19,34)	10,50 (1,91)	2,28 (1,44)	0,16 (0,01)	16,50 (3,11)	10,50 (1,91)	5,53 (0,36)	35,25 (2,36)	2,27 (0,11)	30,00 (1,16)
90 dias após adubação										
P-*	80,00 (19,98)	15,00 (0,82)	1,20 (0,08)	0,15 (0,02)	21,50 (20,50)	8,48 (3,72)	6,65 (0,24)	35,50 (8,43)	2,33 (0,42)	28,18 (2,40)
P+*	124,50 (71,05)	21,75 (10,90)	1,45 (0,24)	0,15 (0,02)	15,25 (4,92)	8,73 (1,94)	5,95 (0,87)	36,00 (8,12)	2,35 (0,42)	31,28 (2,26)
S-*	84,25 (3,95)	20,50 (6,19)	0,80 (0,00)	0,16 (0,01)	3,50 (1,29)	8,20 (2,69)	6,35 (0,13)	38,00 (2,31)	2,26 (0,12)	34,14 (2,84)
S+*	65,50 (13,23)	12,25 (2,50)	1,15 (0,19)	0,16 (0,00)	16,25 (4,27)	13,50 (4,04)	5,75 (0,57)	37,00 (0,82)	2,45 (0,08)	31,68 (4,71)
139 dias após adubação										
P-*	110,00 (28,95)	17,25 (3,77)	1,58 (0,05)	0,14 (0,01)	11,25 (2,06)	5,90 (0,00)	6,63 (0,17)	31,75 (1,71)	1,95 (0,15)	30,03 (1,71)
P+*	98,00 (74,68)	15,00 (8,64)	1,78 (0,30)	0,14 (0,02)	11,75 (5,62)	5,90 (0,00)	5,98 (0,81)	33,25 (10,47)	1,97 (0,35)	35,15 (4,31)
S-*	71,50 (16,23)	13,00 (3,56)	1,08 (0,17)	0,14 (0,01)	12,50 (6,35)	5,90 (0,00)	6,38 (0,33)	33,25 (6,63)	1,94 (0,05)	30,29 (2,68)
S+*	55,50 (14,20)	11,00 (2,94)	1,50 (0,37)	0,14 (0,01)	10,25 (1,50)	6,95 (1,46)	5,88 (0,33)	34,00 (1,63)	1,91 (0,06)	30,33 (1,73)

Tabela 3 - Valores médios de concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), nitrogênio total (N), fósforo (P), enxofre (S), pH (CaCl₂), matéria orgânica do solo (M.O.), carbono total (C) e umidade (U) ... (conclusão)

	Ca	Mg (mmol _c dm ⁻³)	K	N (%)	P (mg dm ⁻³)	S	pH	M.O. (g dm ⁻³)	C (%)	U
195 dias após adubação										
P-*	91,00 (20,12)	26,75 (13,89)	1,18 (0,22)	0,14 (0,02)	12,25 (1,26)	9,25 (2,21)	6,05 (0,30)	33,00 (4,55)	2,07 (0,28)	19,14 (2,41)
P+*	107,25 (51,76)	26,50 (21,44)	1,40 (0,29)	0,14 (0,05)	11,50 (4,12)	11,00 (2,70)	6,00 (0,55)	33,00 (8,37)	2,05 (0,67)	21,88 (2,90)
S-*	72,25 (11,15)	16,75 (2,63)	0,88 (0,05)	0,16 (0,02)	8,25 (2,22)	6,73 (0,55)	6,15 (0,10)	32,75 (1,71)	2,12 (0,17)	23,48 (0,70)
S+*	53,25 (10,81)	12,00 (1,63)	1,63 (1,00)	0,15 (0,02)	10,75 (2,87)	9,73 (3,02)	5,55 (0,37)	31,25 (2,50)	2,05 (0,16)	24,16 (0,84)
258 dias após adubação										
P-*	111,45 (28,92)	13,25 (1,71)	1,35 (0,26)	0,14 (0,03)	18,25 (1,71)	6,18 (0,55)	5,95 (0,17)	35,75 (1,50)	2,14 (0,43)	20,54 (4,90)
P+*	112,00 (99,74)	15,25 (6,90)	1,30 (0,16)	0,15 (0,04)	23,75 (5,56)	8,75 (1,50)	5,73 (0,52)	34,75 (9,95)	2,23 (0,60)	15,63 (6,28)
S-*	70,50 (8,50)	11,00 (1,41)	0,92 (0,10)	0,15 (0,02)	13,50 (1,29)	5,90 (0,00)	5,75 (0,19)	32,25 (2,63)	2,21 (0,22)	18,62 (1,27)
S+*	59,25 (10,44)	11,00 (1,83)	1,70 (0,29)	0,15 (0,01)	15,25 (3,59)	7,23 (1,29)	5,43 (0,31)	33,00 (2,58)	2,08 (0,14)	19,36 (2,06)

3.5 Extração de DNA do solo

Os DNAs de 176 amostras (4 tratamentos x 4 repetições x 11 tempos de amostragem) foram extraídos a partir de 0,25 g de solo de cada uma das parcelas experimentais ao longo do tempo usando o *Kit PowerSoil DNA Isolation* (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o manual do fabricante. A validação da qualidade e quantidade de DNA extraído foi realizada com o uso do aparelho NanoDrop 1000 espectrofotômetro (*Thermo Scientific*, Waltham, EUC).

A concentração de DNA nas amostras variou de 11 a 69 ng μL^{-1} , e a razão $A_{260/280}$ foi entre 1,8 e 2,4. Estes valores indicam alta pureza no DNA extraído com o mínimo de contaminação de proteínas e fenóis ($A_{260/280}$). Os valores médios de ácido nucléico (DNA) e da razão $A_{260/280}$ encontrados nas amostras foram 36 ng μL^{-1} e 1,9, respectivamente.

3.6 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR)

Os ensaios de PCR (reação em cadeia da polimerase ou em inglês *polymerase chain reaction*) quantitativo em tempo real foram realizados em microplacas de 96 poços usando o termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), no Netherlands Institute of Ecology da KNAW (Wageningen, Países Baixos). Os ensaios foram realizados em 60 amostras (quatro tratamentos x três repetições por tratamento x cinco amostragens), que incluíram a amostragem realizada antes da quinta fertilização; e transcorridos quatro e seis dias da quinta fertilização; e nos meses de janeiro e março de 2018.

As reações foram realizadas em duplicatas para determinação da abundância de: procaríotos (gene 16S rRNA), fungos totais (gene ITS), arqueias (AOA) e bactérias (AOB) oxidantes de amônia (enzima amônia monooxigenase, gene *amoA*), desnitrificantes (genes *nirS*, *nirK*, *nosZ* clado I e *nosZ* clado II) e fixadores de nitrogênio (enzima nitrogenase, gene *nifH*). A ausência de inibição ou amplificação positiva nos controles negativos foram observadas em todas as reações de cada gene alvo.

As reações foram realizadas em um volume total de 10-12 μl contendo: corante SYBR Green, *primers* específicos, DNA molde e H_2O Milli-Q. Os *primers* e as condições dos ensaios de PCR em tempo real foram detalhados na Tabela 4. As curvas para análise de especificidade foram obtidas aumentando 0,05°C/s para aquisição dos dados até 95°C em 5 segundos (confirmando também a não amplificação dos controles negativos).

Os resultados de abundância de genes foram expressos em número de cópias de gene por grama de solo seco. Para o cálculo foi considerado o peso seco do solo dividido pela quantidade de H₂O Milli-Q usada no ensaio; o valor obtido foi multiplicado pela quantidade de DNA molde; dividido pelo valor de diluição (10) usado para todos os ensaios, obtendo-se o valor em gramas de solo seco por reação. Por fim, o valor do número de cópias por reação (*SQ*), aferido pelo termociclador, foi dividido pelo valor do peso em gramas de solo seco por reação. Os resultados foram referidos em milhões de cópias g⁻¹, quando em potência 10⁶.

Tabela 4 – Pares de primers dos genes 16S rRNA (*Bacteria* e *Archaea*), ITS (fungo), *amoA* (*Bacteria* e *Archaea*), *nirS*, *nirK*, *nifH*, *nosZ* (clados I e II) e as respectivas funções, sequências e tamanhos do fragmento e condições de amplificação para as reações de PCR quantitativo em tempo real com os valores da eficiência e do R² obtidos na curva padrão de cada reação (continua)

Genes alvo	Primers	Função	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento (bp)	Condições de amplificação	Eficiência e R ²	Referência
16S rRNA <i>Bacteria</i>	EUB 338 EUB 518	RNA ribossomal de <i>Bacteria</i>	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	468	50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 segundo a 72°C e 10 minutos a 95°C para aquisição da fluorescência.	71,5 & 0,96	(Fierer et al., 2005)
16S rRNA <i>Archaea</i>	915 1017r	RNA ribossomal de <i>Archaea</i>	AGGAATTGGCGGGGAGCAC GGCCATGCACCWCCTCTC	112	95°C por 10 minutos, 95°C por 10 segundos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C, seguido de 10 segundos a 95°C.	78,6 & 0,99	(Klindworth et al., 2013)
ITS Fungo	FF390 FR1	RNA ribossomal de Fungo	CGATAACGAACGAGACCT AICCATTCAATCGGTAIT	390	95°C por 2 minutos, 95°C por 5 segundos, seguido de 40 ciclos por 10 segundos a 52°C, 20 segundos a 72°C, seguido de 10 segundos a 95°C.	86,7 & 0,99	(Vainio; Hantula, 2000)
<i>amoA</i> <i>Bacteria</i>	amoA1F amoA2R	Oxidação da amônia por bactérias	GGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTC	491	95°C por 10 minutos, 95°C por 10 segundos, seguido de 45 ciclos de 25 segundo a 65°C para aquisição da fluorescência.	79,8 & 0,96	(Rotthauwet; Witzel; Liesack, 1997)
<i>amoA</i> <i>Archaea</i>	Arch-amoAF Arch-amoAR	Oxidação da amônia por arqueias	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	635	95°C por 5 minutos, 95°C por 10 segundos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 64°C, 20 segundos a 72°C para aquisição da fluorescência.	89 & 0,99	(Francis et al., 2005)
<i>nirS</i>	cd3aF R3cd	Redução do nitrito (contendo-cytochrome cd1)	G TSAACG TSAAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTGA	425	95°C por 5 minutos, 95°C por 10 segundos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 63°C e 20 segundos a 72°C para aquisição da fluorescência.	81,4 & 0,99	(Throback et al., 2004)

Tabela 4 – Pares de primers dos genes 16S rRNA (*Bacteria* e *Archaea*), ITS (fungos), *amoA* (*Bacteria* e *Archaea*), *nirS*, *nirK*, *nifH*, *nosZ* (clados I e II) e as respectivas funções, sequências e tamanhos do fragmento e condições de amplificação para as reações de PCR quantitativo em tempo real com os valores da eficiência e do R² obtidos na curva padrão de cada reação (conclusão)

Genes alvo	Primers	Função	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento (bp)	Condições de amplificação	Eficiência e R ²	Referência
<i>nirK</i>	NirK876 NirK1040	Redução do nitrito (contendo-Cu)	ATYGGCGGVAYGGCGA GCCTCGATCAGRTRTGTGTT	165	95°C por 5 minutos, 95°C por 15 segundos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 62°C e 20 segundos a 72°C para aquisição da fluorescência.	103,5 & 0,98	(Henry et al., 2004)
<i>nifH</i>	PolF PolR	Nitrogenase redutase	TGCGAYCCSAARGCBGACTC TGCGAYCCSAARGCBGACTC	360	50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, um minuto a 72°C, seguido de 95°C.	61,9 & 0,95	(Poly et al., 2001)
<i>nosZ</i> clado I	nosZ2F nosZ2R	Redução do óxido nitroso (N ₂ O)	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	276	95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 64°C e 20 segundos a 72°C, seguido de 95°C por 10 segundos.	51,4 & 0,99	(Henry et al., 2006)
<i>nosZ</i> clado II	nosZIIF nosZIIR	Redução do óxido nitroso (N ₂ O)	CTIGGICCIYTKCAYAC GCIGARCARAAITCBGTRC	600	95°C por 3 segundos, seguido de 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 30 segundos a 72°C, seguido 95°C.	67,9 & 0,99	(Jones et al., 2013)

Nota: A eficiência da curva e o R² foram calculados a partir da curva padrão (diluição em 10 x) de cada gene alvo e os valores aqui apresentados correspondem às médias das duplicatas de reação.

3.7 Sequenciamento de fragmento dos genes 16S rRNA e ITS de fungos

Foram utilizados 20 µm do DNA extraído das amostras de solo para análise de sequenciamento de fragmentos de 16S rRNA e da região ITS no rRNA de fungos pela plataforma Illumina MiSeq (Génome Québec, Montreal, Canada) usando MiSeq Reagente Kit v2 (2 x 250 bp). Foi realizado o sequenciamento de ambas as extremidades do fragmento (sequências *paired-end*) para propiciar alta qualidade de sequências produzidas, facilitar a detecção de rearranjos e elementos repetitivos e produzir o dobro do número de leituras.

O sequenciamento do fragmento 16S rRNA foi realizado usando os *primers* 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) /806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) da região V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO et al., 2012) e foram usados os *primers* ITS1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) /ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) para sequenciar o fragmento ITS para fungos (GARDES, 1993; WHITE et al., 1990). As amplificações em PCR foram realizadas usando os conjuntos de *primers* descritos acima.

3.8 Análise dos dados

O processamento dos dados de fragmentos de sequências 16S e ITS, a classificação taxonômica de bactérias e fungos, os cálculos de diversidade (alfa e beta) e de composição taxonômica das comunidades microbianas, os testes Shapiro-Wilk, Levene, ANOVA, Kruskal-Wallis, e os testes *post hoc* Dunn's e Tukey e a correlação de Pearson foram realizados no R, RStudio versão 3.6.3 (R Development Core Team 2020). Os testes estatísticos para todos os parâmetros consideraram significância dos resultados para probabilidade de se rejeitar a hipótese nula $\leq 0,05$. As análises dos dados de abundância dos genes, da composição das comunidades e das diversidades alfa e beta de bactérias e fungos foram realizadas em dois conjuntos: previamente à adubação e posteriormente à adubação.

Previamente às análises estatísticas, as sequências foram processadas usando o pacote *dada2* (CALLAHAN et al., 2016) do R para remoção de ruídos provenientes do processo de sequenciamento e obtenção de uma tabela de variantes de sequências únicas (*Amplicon Sequence Variants*), análoga à tabela de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Para melhorar a sensibilidade do algoritmo *dada2* às sequências raras, a qualidade das sequências de 16S e ITS foi inspecionada e sequências com *quality score* abaixo de 20 foram removidas.

As ASVs ou sequências únicas de bactérias e fungos tiveram suas taxonomias classificadas usando as bases de dados Silva, Silva versão 128 (CALLAHAN, 2017) e UNITE ITS (UNITE COMMUNITY, 2019), respectivamente. Os conjuntos de sequências de bactérias e fungos foram agrupados pelo Domínio Bacteria e pelo Reino Fungi, respectivamente, para evitar a ocorrência de outros organismos nos dados.

As ASVs que não foram registradas mais de cinco vezes entre todas as amostras foram removidas do conjunto de dados usando o comando *filter_taxa()* para filtrar as ASVs de baixas representatividade e ocorrência. Em seguida foram removidas as ASVs que não estavam presentes em nenhuma das amostras e foram excluídas duas amostras do conjunto de dados de bactérias e apenas uma amostra do conjunto de dados de fungos, por apresentarem número total de sequências de escala inferior às outras amostras (menos de 10.000 sequências). E por fim, as ASVs sem classificação taxonômica à nível de filo foram excluídas dos conjuntos de dados por não fornecerem informações necessárias. Para tanto, foram o usados os respectivos comandos *prune_taxa()*, *prune_samples()* e *subset_taxa()* do pacote *phyloseq* (McMURDIE; HOLMES, 2013) do R.

A análise de composição das comunidades de bactérias e fungos associadas aos tratamentos foi feita pela transformação dos dados de contagem de ASVs em abundância relativa e, posterior agrupamento das amostras por categoria de tratamento. Sobre estes dados foram aplicados os testes *One-Way* ANOVA para comparar as abundâncias à nível taxonômico de filo e gênero entre os tratamentos, após os testes de normalidade e homogeneidade das variâncias por Shapiro-Wilk e Levene. Aos dados de abundância de filós e gêneros que não tiveram a distribuição normal foi aplicado o teste Kruskal-Wallis com a mesma finalidade do teste ANOVA.

A diversidade alfa das comunidades de arqueias, bactéria e fungo foi representada pelo número de espécies observadas e pelo índice de Shannon. O índice de espécies observadas é definido como a riqueza, que mede o número de ASVs diferentes por amostra. O índice de diversidade de Shannon considera o tamanho de cada ASV como uma probabilidade, levando em consideração o número de ASVs e as ASVs dominantes. O cálculo dos índices de diversidade alfa (riqueza e índice de Shannon) foi realizado para cada amostra utilizando o comando *estimate_richness()* do R, como recomendado por Hill et al. (2003). As ASVs de baixa ocorrência e todas as amostras foram mantidas no conjunto de dados para a obtenção de estimativas representativas de diversidade alfa. Os cálculos da diversidade alfa das comunidades de bactérias e fungos contemplaram 8.735 e 5.096 táxons (ASVs), respectivamente. Para investigar mudanças na comunidade de bactérias e na comunidade de

fungos, os índices de diversidade alfa foram comparados entre os tratamentos em período anterior e posterior à adubação dos tratamentos P+* e S+*. O teste Kruskal-Wallis foi aplicado nos índices de riqueza e Shannon para verificar os efeitos de tratamento na diversidade alfa. O teste *post hoc* Dunn foi aplicado para identificar as diferenças significativas aos pares das amostras.

Para a análise de diversidade beta foi necessário verificar a homogeneidade de dispersão das comunidades de bactérias e fungos, entre os grupos de tratamentos testados em relação às ASVs presentes nas amostras, testadas por ANOVA. A dispersão homogênea entre os grupos de tratamentos foi condição para as análises de diversidade beta. O cálculo da diversidade beta foi realizado utilizando o método de ordenação por escalonamento multidimensional não métrico (*non-metric multidimensional*) e o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, para o cálculo das distâncias dos dados originais. Os dados de abundância de ASVs foram transformados em abundância relativa e o teste de variância permutacional (PERMANOVA) foi aplicado nos dados transformados para testar o efeito dos tratamentos na diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos usando a função Adonis do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do R com 999 permutações. O teste *post hoc pairwiseAdonis* (MARTINEZ-ARBIZU, 2020) do R foi usado para identificar as diferenças significativas entre os tratamentos. Estas análises foram realizadas com as ASVs dos filos mais abundantes de bactérias e fungos sem perda dos padrões intrínsecos dos dados.

Os dados das formas inorgânicas de nitrogênio, das concentrações de C, N, dos macronutrientes e das abundâncias dos genes das comunidades microbianas dos solos tiveram suas normalidades e homogeneidade das variâncias testadas pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando necessário, os dados foram transformados. As variáveis foram comparadas entre os tratamentos por *One-Way* ANOVA. O teste *posthoc* Tukey foi aplicado para detectar as diferenças significativas entre os tratamentos utilizando a função *TukeyHSD* do R.

4 RESULTADOS

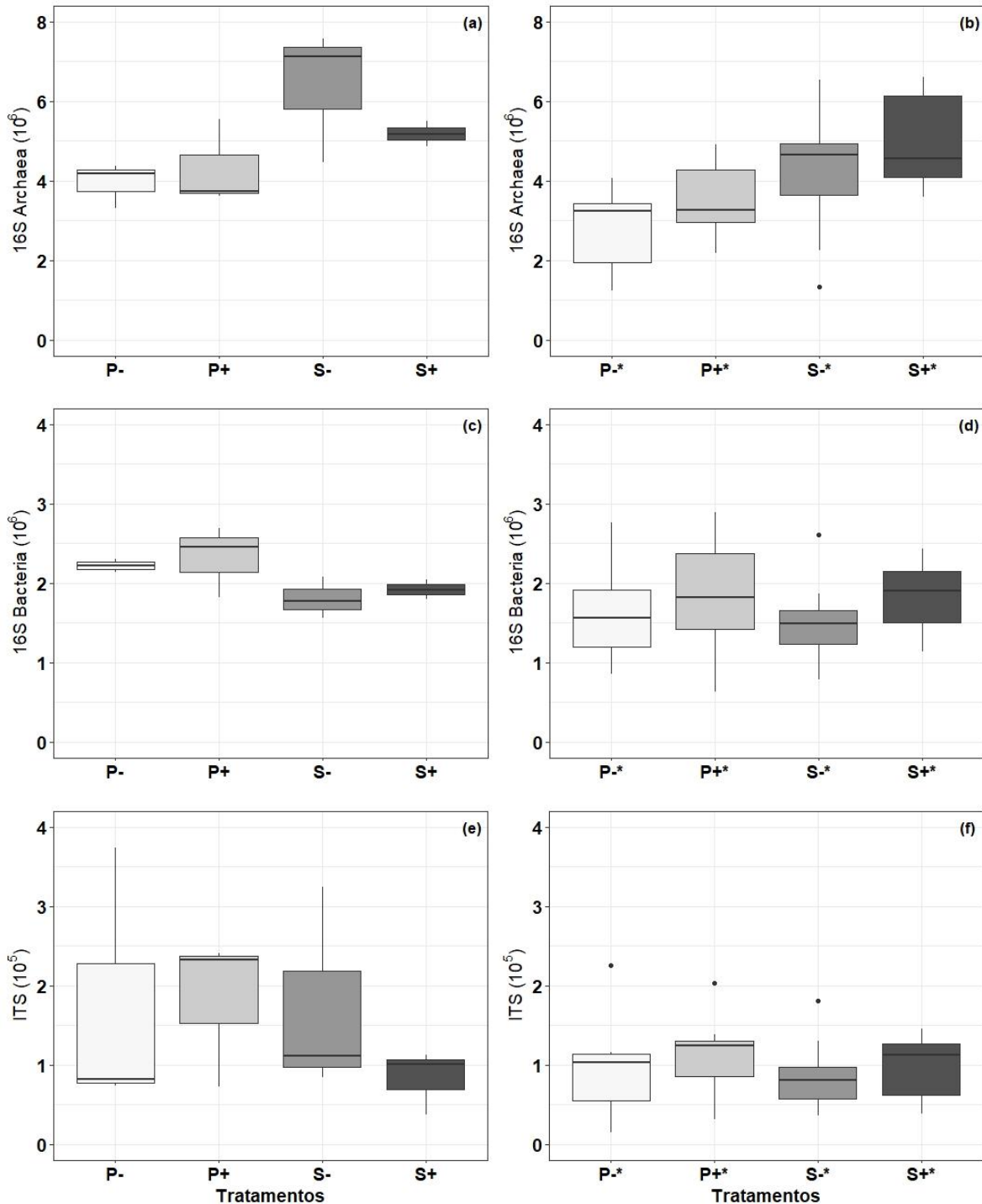
4.1 Abundância dos grupos microbianos no solo

Por meio do método de quantificação em tempo real por PCR foram mensuradas as abundâncias dos principais grupos microbianos relacionados ao ciclo do nitrogênio no solo. As determinações das abundâncias absolutas dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, assim como, dos organismos pertencentes ao reino Fungi foram feitas usando os respectivos genes 16S rRNA de *Archaea*, 16S rRNA de *Bacteria* e ITS de fungos. Os grupos de microrganismos relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio tiveram sua abundância quantificada pelo gene *nifH*, a abundância dos grupos associados às etapas de nitrificação foi determinada pelo gene *amoA* (de AOA e AOB) e as etapas desnitrificação foram verificadas pela quantificação dos genes *nirS*, *nirK* e *nosZ*.

Nos solos sob pastagem e cana-de-açúcar as abundâncias de arqueias e bactérias foram maiores em relação à abundância de fungos (Figura 5). Na amostragem conduzida antes da adubação, as abundâncias de arqueias, bactérias e fungos não diferiram entre P- e P+ ou S- e S+ (Figura 5a, 5c, 5e). No entanto, nessas amostras, a abundância média de arqueias sob pastagem foi menor (p -ajustado $< 0,05$) que sob cana-de-açúcar (Figura 5a). A mesma diferença continuou nas amostras que foram coletadas após a adubação (p -ajustado $< 0,01$) (Figura 5b).

Diferentemente do que foi encontrado para as arqueias, foi observado que apenas antes da adubação, a abundância de bactérias foi inferior no solo sob cana-de-açúcar comparada à pastagem (p -ajustado $< 0,05$; Figura 5c). Posteriormente à adubação, não foram detectadas alterações nos valores de abundância de bactérias e fungos (Figura 5d, 5f).

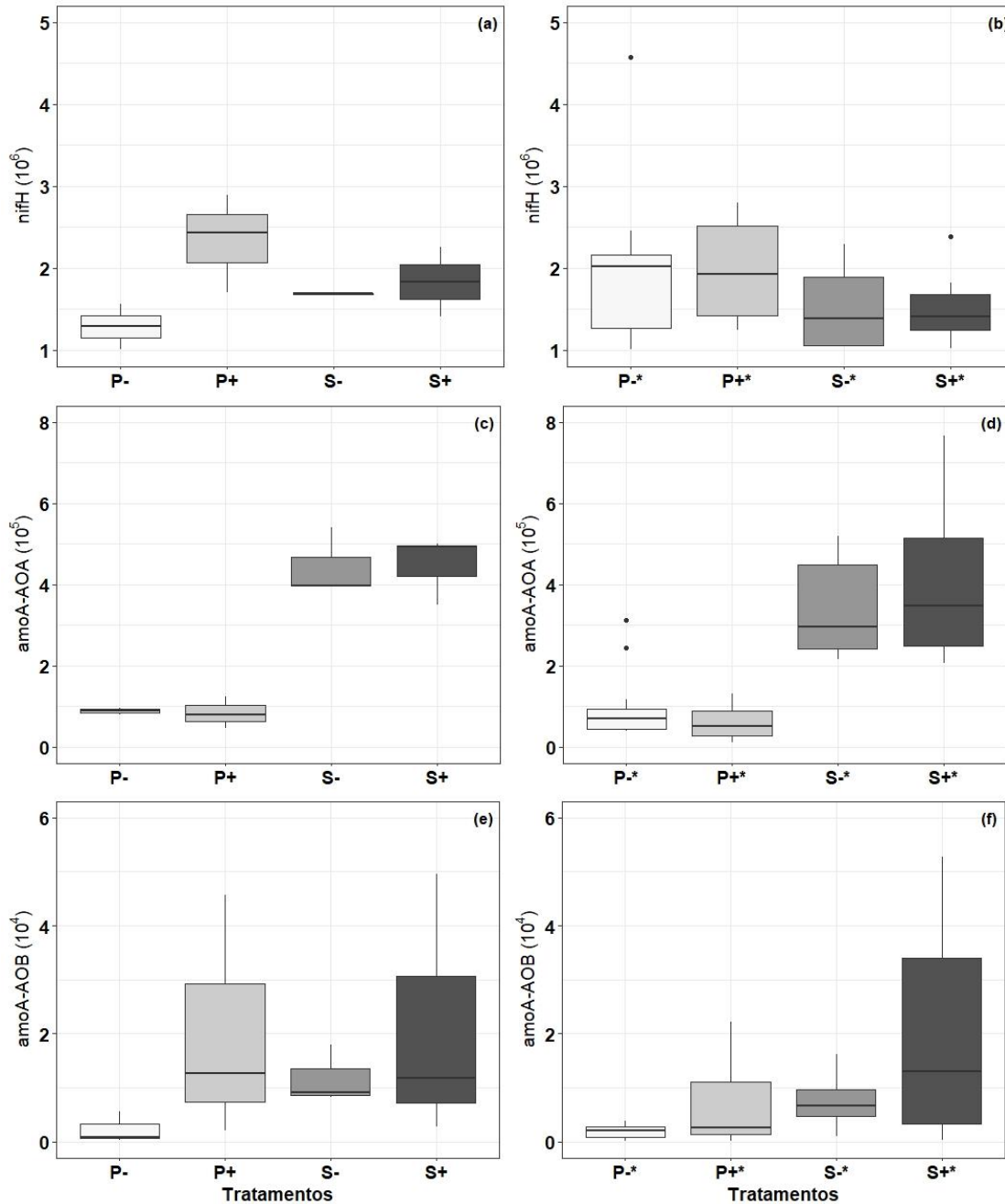
Figura 5 - Box-plot do número de cópias de 16S rRNA de *Archaea*, 16S rRNA de *Bacteria* e ITS de fungos no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*), na camada de 0-10 cm, anteriormente e posteriormente à adubação. (a) 16S de *Archaea* antes da adubação, (b) 16S de *Archaea* depois da adubação, (c) 16S de *Bacteria* antes da adubação, (d) 16S de *Bacteria* depois da adubação, (e) ITS de fungos antes da adubação, (f) ITS de fungos depois da adubação. Os valores foram representados em número de cópias de gene por grama de solo seco. As barras de erro representam o desvio padrão das médias (antes da adubação: $n=6$; depois da adubação: $n=30$) e os pontos pretos maciços representam *outliers*



Antes da adubação, as abundâncias dos genes *nifH* e *amoA* (AOB) não diferiram entre os usos do solo (Figura 6a e 6e). Enquanto a abundância de arqueias oxidadoras de amônia (*amoA* AOA) diferiu, antes da adubação, entre as parcelas com pastagem e cana-de-açúcar (p -ajustado $< 0,001$), sendo os valores mais elevados encontrados no solo sob cana-de-açúcar ($0,45 \pm 0,06$ milhões cópias g^{-1}) comparado ao solo sob pastagem ($0,09 \pm 0,06$ milhões cópias g^{-1}) (Figura 6c).

Após a adubação, a variação na abundância de *amoA* (AOA) se manteve e valores estatisticamente diferentes foram observados entre P-* e S-* e entre P+* e S+* (p -ajustado $< 0,001$; Figura 6d), com maiores valores em solos sob cana-de-açúcar (S-*/S+*). A abundância de *amoA* (AOB) não foi modificada pela adubação, no entanto, os valores médios de *amoA* (AOB) foram maiores nos solos sob cana-de-açúcar do que em solos sob pastagem (p -ajustado $< 0,01$; Figura 6f), e ainda, a abundância de *amoA* (AOB) variou entre P+* e S+* (p -ajustado $< 0,01$). Nessa mesma amostragem, a abundância do gene *nifH* foi superior na pastagem do que na cana-de-açúcar ($p < 0,1$; Figura 6b).

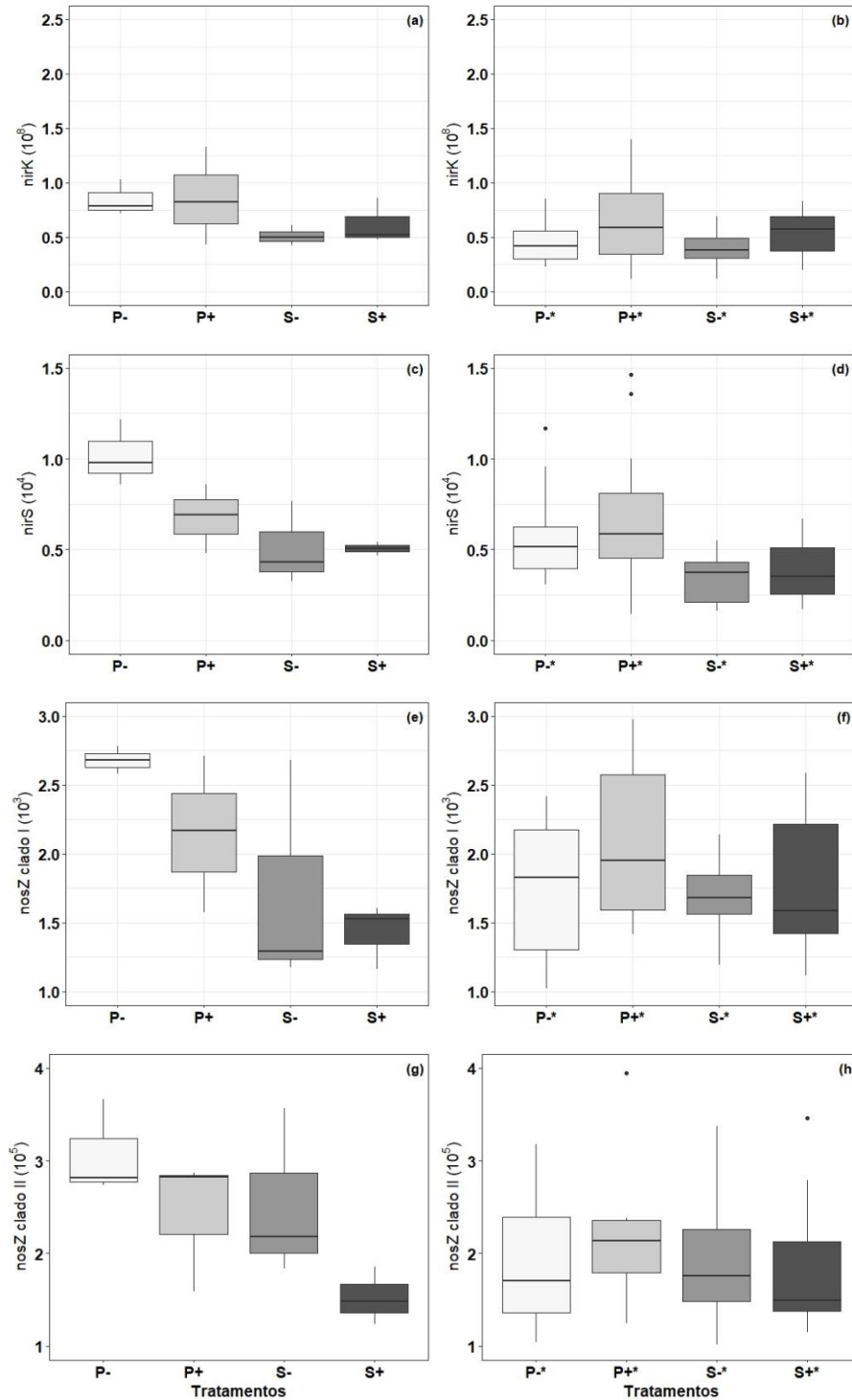
Figura 6 – Box-plot do número de cópias de *nifH*, *amoA* (AOA) e *amoA* (AOB) no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*), na camada de 0-10 cm, anteriormente e posteriormente à adubação. (a) *nifH* antes da adubação, (b) *nifH* depois da adubação, (c) *amoA* (AOA) antes da adubação, (d) *amoA* (AOA) depois da adubação, (e) *amoA* (AOB) antes da adubação, (f) *amoA* (AOB) depois da adubação. Os valores foram representados em número de cópias de gene por grama de solo seco. As barras de erro representam o desvio padrão das médias (antes da adubação: $n=6$; depois da adubação: $n=30$) e os pontos pretos maciços representam *outliers*



Antes da adubação, as abundâncias dos genes *nirS* e *nosZ* clado I foram maiores em solos sob pastagem quando comparadas à cana-de-açúcar ($p < 0,05$; Figura 7c, 7e). E ainda foi observado que a abundância de *nirS* variou significativamente entre as parcelas P- e S- (p -ajustado $< 0,05$). Nessa mesma amostragem, a abundância de *nirK* foi estatisticamente maior na pastagem do que na cana-de-açúcar ao nível de 10% de significância (p -ajustado $< 0,1$; Figura 7a).

Após a aplicação do adubo, os genes *nirS* ($p < 0,001$) e *nosZ* do clado I ($p < 0,05$) permaneceram mais abundantes no solo com pastagem (P-*/P+*) quando comparados ao solo com cana-de-açúcar (S-*/S+*) (Figura 7d, 7f). A abundância do gene *nosZ* do clado II foi superior à do gene *nosZ* do clado I no solo sob pastagem e cana-de-açúcar antes e depois da adubação (Figura 7g-7h).

Figura 7 - Box-plot do número de cópias de *nirK*, *nirS*, *nosZ* clados I e II no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*), na camada de 0-10 cm, anteriormente e posteriormente à adubação. (a) *nirK* antes da adubação, (b) *nirK* depois da adubação, (c) *nirS* antes da adubação, (d) *nirS* depois da adubação, (e) *nosZ* clado I antes da adubação, (f) *nosZ* clado I depois da adubação, (g) *nosZ* clado II antes da adubação, (h) *nosZ* clado II depois da adubação. Os valores foram representados em número de cópias de gene por grama de solo seco. As barras de erro representam o desvio padrão das médias (antes da adubação: $n=6$; depois da adubação: $n=30$) e os pontos pretos maciços representam *outliers*



4.2 Composição das comunidades microbianas nos diferentes usos de solo

O processamento dos dados de fragmentos de 16S e ITS de 176 amostras resultou em aproximadas 2,8 e 3,6 milhões de fragmentos de sequências de qualidade, respectivamente. As medianas de sequências por amostra foram de 15.282 para 16S e 20.140 para ITS. As sequências de 16S tiveram suas taxonomias classificadas em 9.475 variantes de fragmentos únicos (ASVs), enquanto o sequenciamento de ITS resultou em 5.667 ASVs. As atribuições taxonômicas para ambas as comunidades foram realizadas com 97% de identificação. Após a remoção de táxons com abundâncias muito baixas ou ausentes foram conservadas 7.644 ASVs de bactérias e 3.961 ASVs de fungos para as análises das comunidades.

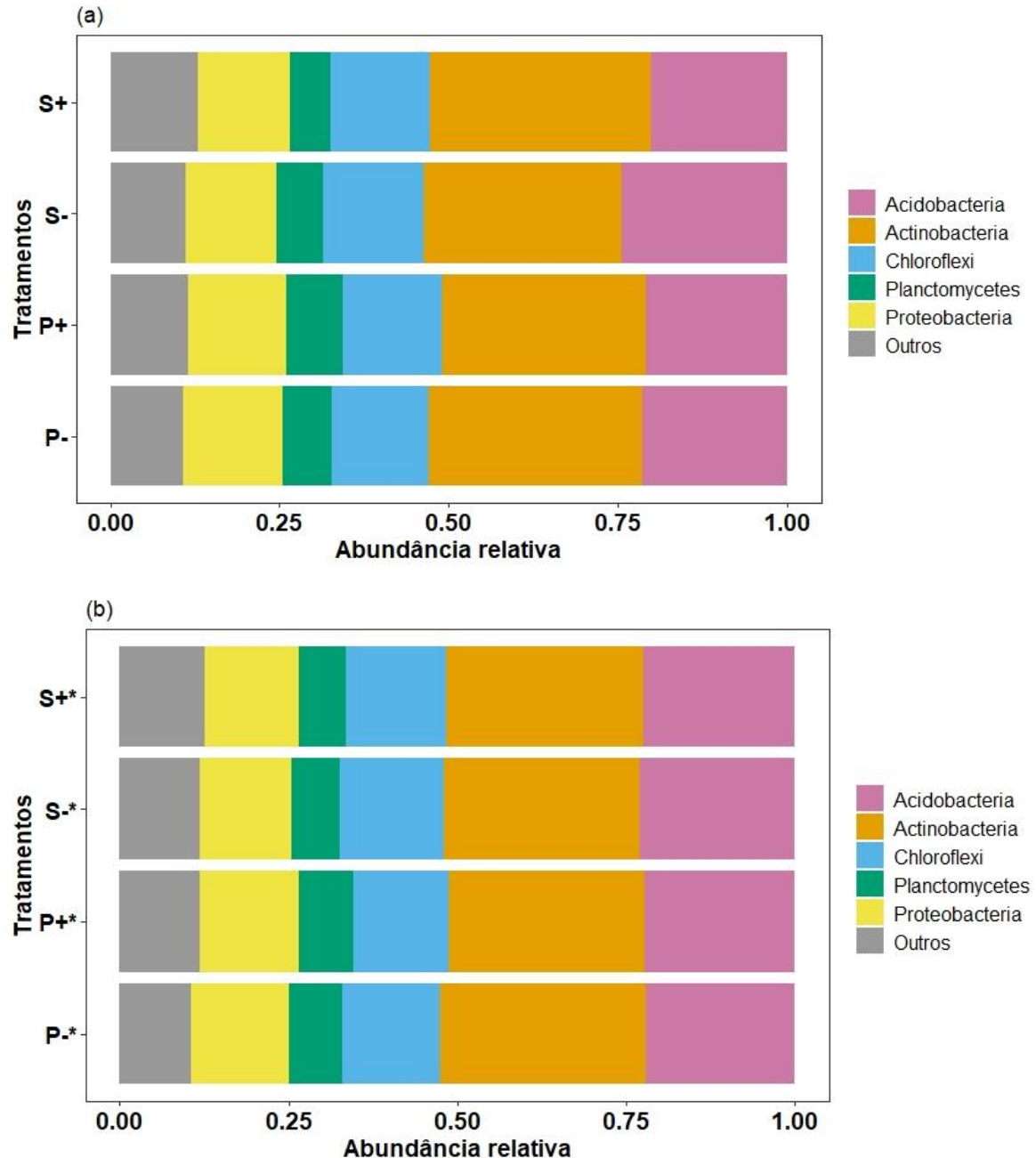
Os fragmentos de sequências de 16S rRNA resultantes foram classificados em 35 filos, 118 ordens, 231 famílias e 331 gêneros bacterianos. Antes e depois da adubação, foram encontrados cinco filos predominantes que totalizaram mais de 85% da comunidade bacteriana no solo sob pastagem e cana-de-açúcar, sendo em média 30% de *Actinobacteria*, 22% *Acidobacteria*, 15% *Chloroflexi*, 14% *Proteobacteria* e 7% *Planctomycetes* (Figura 8). *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* e *Verrucomicrobia* foram identificados em abundâncias relativamente baixas.

Antes da adubação, apenas a abundância relativa de *Planctomycetes* foi variável entre os tratamentos, com maior proporção sob P+ em relação à S+ ($p < 0,05$; Figura 8a). Ainda nesta amostragem, a ocorrência de gêneros bacterianos associados à fixação de nitrogênio, como o gênero *Frankia*, pertencente ao filo *Actinobacteria*, foi identificada no solo com cana-de-açúcar não adubada (S-) em 0,2% de abundância relativa. No solo com pastagem e cana-de-açúcar foram encontrados os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (filo *Proteobacteria*), bactérias promotoras de crescimento das plantas, que incluem organismos associados ao processo de fixação biológica do nitrogênio. A abundância relativa do gênero *Bradyrhizobium* foi de aproximadamente $2,3\% \pm 1,2$ sob pastagem e cana-de-açúcar. E o gênero *Rhizobium* que foi encontrado apenas na cana-de-açúcar (S+) teve $0,2\% \pm 0,4$ de abundância. O filo *Nitrospirae*, com abundância média de $4,3\% \pm 0,9$ na pastagem e $3,5 \pm 1,2\%$ na cana-de-açúcar, abrange gêneros de bactérias associados ao processo de nitrificação, entre eles foi identificada a presença do gênero *Nitrospira* no solo sob pastagem não adubada (P-) e cana-de-açúcar (S-/S+). Ainda na amostragem anterior à adubação, diferença significativa na abundância do gênero *Nitrospira* foi encontrada entre os usos de solo (p ajustado $< 0,05$), com maior abundância sob cana-de-açúcar em relação à pastagem.

Após a adubação, foram encontradas diferenças entre os usos de solo na abundância relativa dos filos *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Planctomycetes* (Figura 8b). No solo sob pastagem foram encontradas maiores abundâncias de bactérias dos filos *Proteobacteria* e *Planctomycetes* quando comparadas à cana-de-açúcar (p ajustado $< 0,001$). Além disso, a abundância de *Planctomycetes* na pastagem adubada (P+*) foi significativamente maior em relação à encontrada na cana-de-açúcar adubada (S+*) ($p < 0,01$). Já na cana-de-açúcar, foi encontrada maior abundância relativa do filo *Chloroflexi* em relação à pastagem (p ajustado $< 0,05$).

Transcorrida a adubação, no solo sob pastagem a abundância relativa do gênero *Frankia* foi maior que no solo sob cana-de-açúcar ($p < 0,05$), diferente do que havia sido constatado antes da adubação. Nessa amostragem, a abundância relativa de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foi maior no solo sob pastagem do que no solo sob cana-de-açúcar ($p < 0,01$) e, na cana-de-açúcar, a abundância de *Bradyrhizobium* foi maior sob S+* do que sob S-* ($p < 0,01$). E ainda, os valores de abundância do gênero *Nitrospira*, após a adubação, permaneceram maiores no solo sob cana-de-açúcar em relação ao solo sob pastagem ($p < 0,001$).

Figura 8 - Abundância relativa de bactérias no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*). (a) Abundância relativa de bactérias em período anterior à adubação, (b) abundância relativa de bactérias em período posterior à adubação. O comprimento da barra representa a abundância relativa das ASVs classificadas como filos bacterianos dentro de cada categoria de tratamento. Os filos mais abundantes foram representados em destaque, os demais foram agrupados como “Outros” em cor cinza

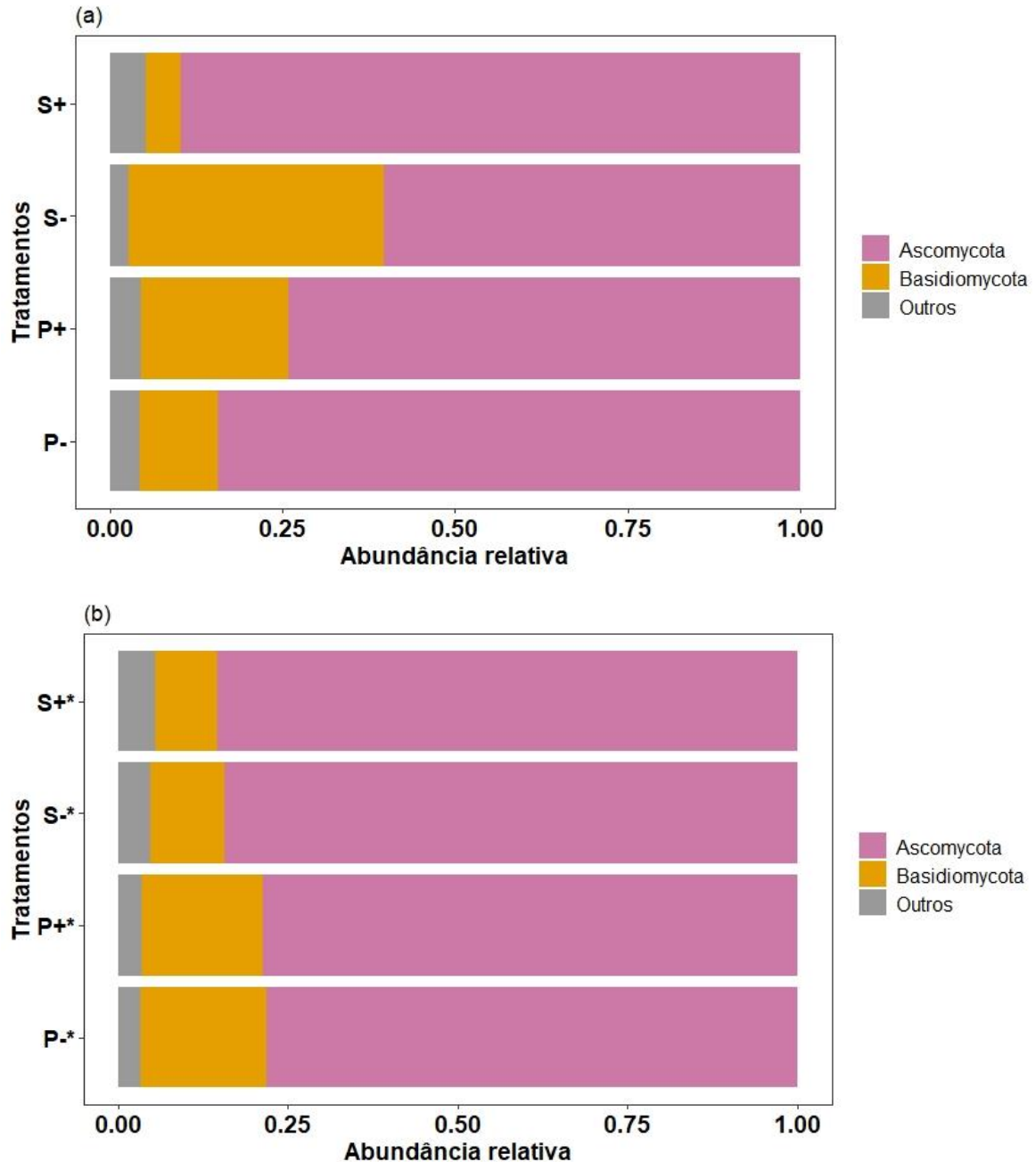


Aos fragmentos de ITS foram atribuídos 11 filos, 83 ordens, 181 famílias e 344 gêneros de fungos. No solo com pastagem e cana-de-açúcar, os filos fúngicos predominantemente foram Ascomycota e Basidiomycota, com abundância maior de 90% de toda comunidade de fungos em ambos os usos de solo (Figura 9). Antes da adubação, a abundância de Ascomycota não foi diferente estatisticamente entre as parcelas (Figura 9a). Por outro lado, também antes da adubação, diferenças na abundância do filo Basidiomycota foram significativas entre S- e S+ ($p < 0,05$) e a abundância do gênero *Talaromyces*, da ordem Eurotiales, foi maior no solo sob S+ do que no solo sob P+ ($p\text{-ajustado} < 0,05$).

Após a adubação, a abundância de Ascomycota foi maior no solo sob cana-de-açúcar adubada (S+*) do que no solo sob pastagem adubada (P+*) (Figura 9b; $p\text{-ajustado} < 0,01$). E, os valores de abundância de Basidiomycota foram maiores na pastagem (P-* e P+*) do que na cana-de-açúcar (S-* e S+*), na amostragem posterior à adubação ($p < 0,001$). Ainda nessa amostragem, dentro da ordem Eurotiales, a abundância de *Aspergillus* foi maior no solo sob cana-de-açúcar não adubada (S-*) do que no solo sob pastagem não adubada (P-*) ($p\text{-ajustado} < 0,1$) e a abundância do gênero *Talaromyces*, foi maior na cana-de-açúcar do que na pastagem ($p < 0,01$), sendo que os valores no solo sob P-* foram maiores do que no solo sob P+ ($p\text{-ajustado} < 0,01$), enquanto na cana-de-açúcar foi observado o oposto: maiores valores em S+* do que em S-* ($p\text{-ajustado} < 0,01$).

Entre os organismos da ordem Hypocreales, a abundância do gênero *Gibberella* teve maiores valores na pastagem adubada (P+*) em relação à pastagem não-adubada (P-*) ($p\text{-ajustado} < 0,1$) e a abundância do gênero *Trichoderma*, foi maior sob S-* do que sob P-* ($p\text{-ajustado} < 0,01$) e, maior sob S+* do que sob P+* ($p\text{-ajustado} < 0,05$).

Figura 9 - Abundância relativa de fungos no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*). (a) Abundância relativa de fungos em período anterior à adubação, (b) abundância relativa de fungos em período posterior à adubação. O comprimento da barra representa a abundância relativa das ASVs classificadas como filos fúngicos dentro de cada categoria de tratamento. Os filos mais abundantes foram representados em destaque, os demais foram agrupados como “Outros” em cor cinza



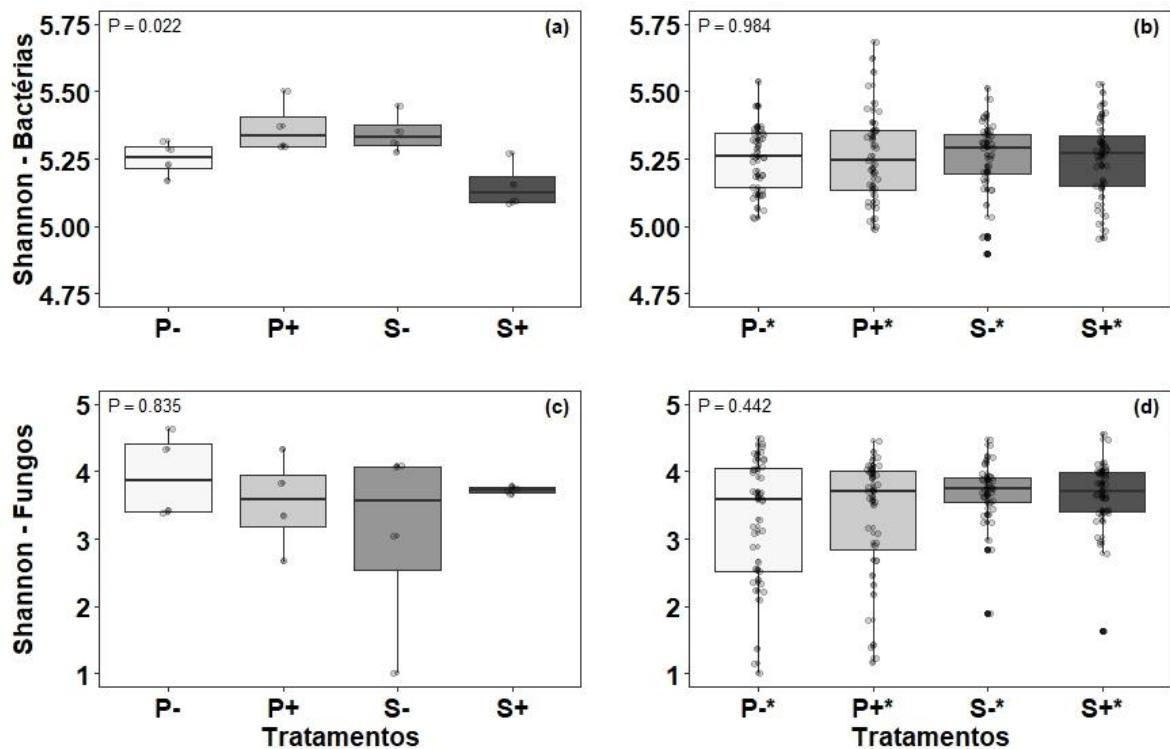
4.3 Diversidade alfa das comunidades de bactérias e fungos do solo

Na amostragem conduzida antes da adubação, a diversidade alfa da comunidade de bactérias foi menor na parcela de cana-de-açúcar S+ em relação às parcelas de cana-de-açúcar S- e de pastagem P+ (p -ajustado $< 0,05$), de acordo com o índice de Shannon (Figura 10a). Ainda antes da adubação, a riqueza (número de ASVs) da comunidade bacteriana no solo sob pastagem e cana-de-açúcar variou de 261 a 380 ASVs. Na pastagem, o valor médio de riqueza de bactérias foi $312 \pm 7,86$ e na cana-de-açúcar foi $306 \pm 7,86$. E nesta amostragem, a riqueza de bactérias foi maior em P+ (333 ± 33) do que em S+ (282 ± 22) (p -ajustado $< 0,05$) e, também foi detectada maior riqueza em S- (331 ± 18) do que em S+ (p -ajustado $< 0,1$).

Transcorrida a adubação, a diversidade alfa de bactérias, pelo índice de Shannon e pela riqueza de táxons, não teve diferenças estatísticas entre P-*, P+*, S-* e S+* (Figura 10b). Nesta amostragem, os valores observados de riqueza de bactérias na pastagem e na cana-de-açúcar foram de 150 a 459 ASVs, com média de $303 \pm 3,7$ ASVs no solo sob pastagem e, $305 \pm 3,71$ na cana-de-açúcar.

Pelo índice de Shannon, a diversidade alfa da comunidade de fungos não diferiu entre os usos de solo e o manejo com adubo antes e depois da adubação ($p > 0,05$; Figura 10c, 10d). No entanto, antes da adubação a riqueza de fungos no solo sob pastagem (P-/P+ $150 \pm 6,96$) foi maior do que no solo sob cana-de-açúcar (S-/S+ $121 \pm 6,96$) ($p < 0,05$). Na amostragem antes da adubação, a riqueza de fungos no solo sob pastagem (P-/P+) e cana-de-açúcar (S-/S+) variou de 82 a 192 ASVs. E, depois da adubação, o valor de riqueza de fungos foi entre 5 e 213 ASVs na pastagem (P-*/P+*) e na cana-de-açúcar (S-*/S+*), sem diferenças estatísticas encontradas entre as parcelas.

Figura 10 – Diversidade alfa representada pelo índice de Shannon H' das comunidades de bactérias e fungos no solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*); pastagem intensiva (P+/P+*); cana-de-açúcar sem fertilizantes (S-/S-*); cana-de-açúcar com fertilizantes (S+/S+*). (a) Diversidade alfa de bactérias em período anterior à adubação, (b) diversidade alfa de bactérias em período posterior à adubação, (c) diversidade alfa de fungos em período anterior à adubação, (d) diversidade de fungos em período posterior à adubação. As barras de erro representam o desvio padrão das médias (antes da adubação: $n=4$; depois da adubação: $n=44$) e os pontos pretos maciços representam *outliers*

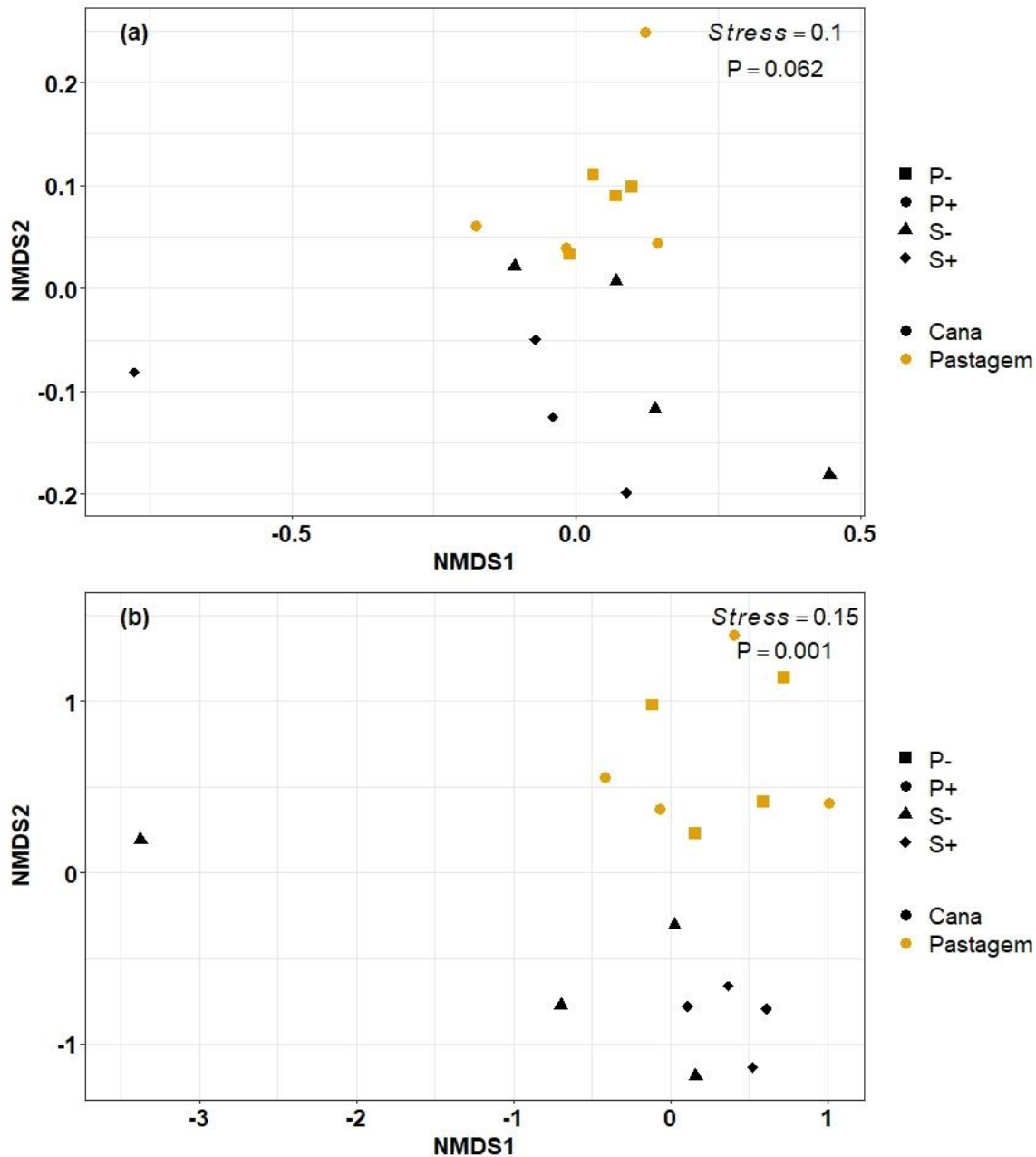


4.4 Diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos do solo

As variações na diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos foram explicadas pelo uso do solo na amostragem anterior à adubação (Figura 11a-11b). Antes da adubação, a variação na diversidade beta da comunidade de bactérias foi explicada em 27% ($r^2 = 0,27$; $p < 0,1$) pela interação entre uso do solo com o manejo de adubo, com diferenças estatísticas entre pastagem (P-/P+) e cana-de-açúcar (S-/S+) (Figura 11a). Nesta amostragem, em torno de 13% das variações na diversidade beta de bactérias na pastagem e na cana-de-açúcar foi explicada por diferenças entre as parcelas não adubadas (P-/S-) e as parcelas adubadas (P+/S+) ($r^2 = 0,13$; $p < 0,05$).

Quanto às variações na diversidade beta dos fungos, 17% ($r^2 = 0,17$; $p < 0,01$) foram explicados pelo uso do solo (pastagem/cana-de-açúcar) antes de ocorrer a aplicação de adubo, com agrupamentos distintos entre o solo sob pastagem e cana-de-açúcar (p ajustado $< 0,01$; Figura 11b).

Figura 11 – Diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) a partir de matriz de dissimilaridade pelo método Bray-Curtis das amostras à nível de sequências únicas (ASVs). Os pontos são representações individuais das amostras de solo sob pastagem (P-/P+) e cana-de-açúcar (S-/S+). (a) Comunidade de bactérias no solo sob pastagem e cana-de-açúcar antes da adubação, (b) comunidade de fungos no solo sob pastagem e cana-de-açúcar antes da adubação. Os valores de *stress* da ordenação por NMDS e o *p* valor estão indicados nos cantos superiores direitos dos gráficos



Na amostragem posterior à adubação, a diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos teve em torno de 30% das variações explicadas pela interação entre o uso do solo e o tempo de experimento. Na comunidade de bactérias, a interação do uso do solo (P-*, P+*, S-* e S+*) com os dias decorridos de adubação explicou 31% ($r^2 = 0,31$; $p < 0,01$) da diversidade beta, transcorrida a adubação.

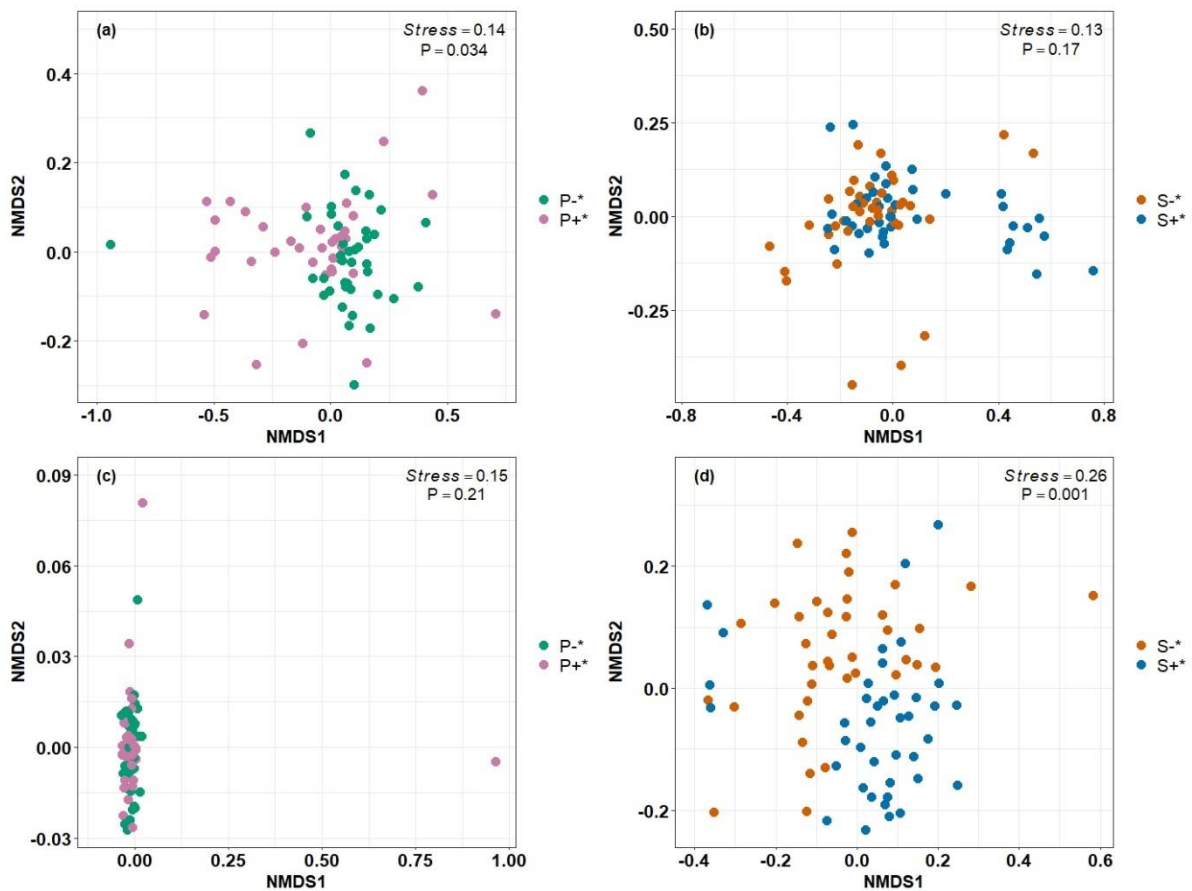
A interação entre o uso do solo (pastagem e cana-de-açúcar) com o manejo de adubo influenciou a variação na diversidade beta das bactérias em 10% ($r^2 = 0,10$; $p < 0,01$), com diferenças encontradas entre P-* e P+*; P-* e S-*; e P+* e S+* (p ajustado $< 0,01$). O uso do solo por pastagem ou cana-de-açúcar explicou apenas 4% das variações encontradas na diversidade beta de bactérias transcorrida a adubação (p ajustado $< 0,01$).

Nas amostras de solo sob pastagem, a diversidade beta das bactérias teve 29% das variações explicadas pela interação entre o manejo de adubo e os dias transcorridos da adubação ($r^2 = 0,29$; $p < 0,05$) (Figura 12a) e, 6% da variação foi explicada pelo manejo de adubo (p ajustado $< 0,01$). Na cana-de-açúcar, a interação entre o manejo de adubo e o tempo influenciou a variação na diversidade beta das bactérias em 27% ($r^2 = 0,27$; $p < 1$) (Figura 12b), e o manejo com adubo explicou 6% da variação na diversidade beta das bactérias, assim como foi observado na pastagem.

Posteriormente à adubação, a diversidade beta dos fungos no solo teve 34% das variações explicadas pela interação entre uso do solo (P-*, P+*, S-* e S+*) com os dias transcorridos de adubação ($r^2 = 0,34$; $p < 0,01$), assim como foi observado na diversidade beta das bactérias também após a adubação.

Ainda nessa amostragem, a diversidade beta dos fungos na pastagem teve 42% da variação explicada pela interação entre o manejo com adubo e os dias decorridos de adubação ($r^2 = 0,42$; $p < 1$) (Figura 12c) e, 14% da variação foi explicada pelos dias transcorridos da adubação ($r^2 = 0,14$; $p < 0,01$). Na cana-de-açúcar, a diversidade beta dos fungos teve sua variação explicada em 33% pela interação entre o manejo com adubo e os dias decorridos da adubação ($r^2 = 0,33$; $p < 0,01$), sendo que esta significância estatística do resultado de Adonis é devida à variação associada à variância não homogênea dos grupos de amostras (S-* / S+*) ($p < 0,05$). 19% da variação na diversidade beta dos fungos na cana-de-açúcar foi explicada pelos dias transcorridos da adubação ($r^2 = 0,19$; $p < 0,01$).

Figura 12 – Diversidade beta das comunidades de bactérias e fungos por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) a partir de matriz de dissimilaridade pelo método Bray-Curtis das amostras à nível de sequências únicas (ASVs). Os pontos são representações individuais das amostras de solo sob pastagem (P-*/P+*) e cana-de-açúcar (S-*/S+*). (a) Comunidade de bactérias no solo sob pastagem (P-*/P+*) nos dias transcorridos da adubação, (b) comunidade de bactérias no solo sob cana-de-açúcar (S-*/S+*) nos dias transcorridos da adubação, (c) comunidade de fungos no solo sob pastagem (P-*/P+*) nos dias transcorridos da adubação, (d) comunidade de fungos no solo sob cana-de-açúcar (S-*/S+*) nos dias transcorridos da adubação. Os valores de *stress* da ordenação por NMDS e o *p* valor estão indicados nos cantos superiores direitos dos gráficos



4.5 Fluxos de óxido nitroso (N₂O)

Utilizou-se dados secundários de emissão e fluxo de N₂O do solo, provenientes do trabalho da Ms. Camila Bolfarini Bento (2020). Foram utilizados os valores referentes às amostragens realizadas entre 14 de novembro de 2017 a 24 de setembro de 2018 para correlacionar com a abundância dos genes associados à ciclagem do nitrogênio. A coleta do gás foi realizada com o auxílio de câmaras estáticas inseridas nos solos de todas as parcelas sob pastagem e cana-de-açúcar. As concentrações dos gases nas amostras de ar foram analisadas

em cromatógrafo gasoso (SHIMADZU GC-2014, Columbia, MD, EUA). Os detalhes de determinação dos fluxos de N_2O , emissão acumulada anual e total, assim como do fator de emissão e CO_2 equivalente estão descritos na seção de Material e Métodos da tese intitulada “Impactos do manejo do solo em área de pastagem extensiva convertida em cultivo de cana-de-açúcar e em pastagem intensiva” (BENTO, 2020).

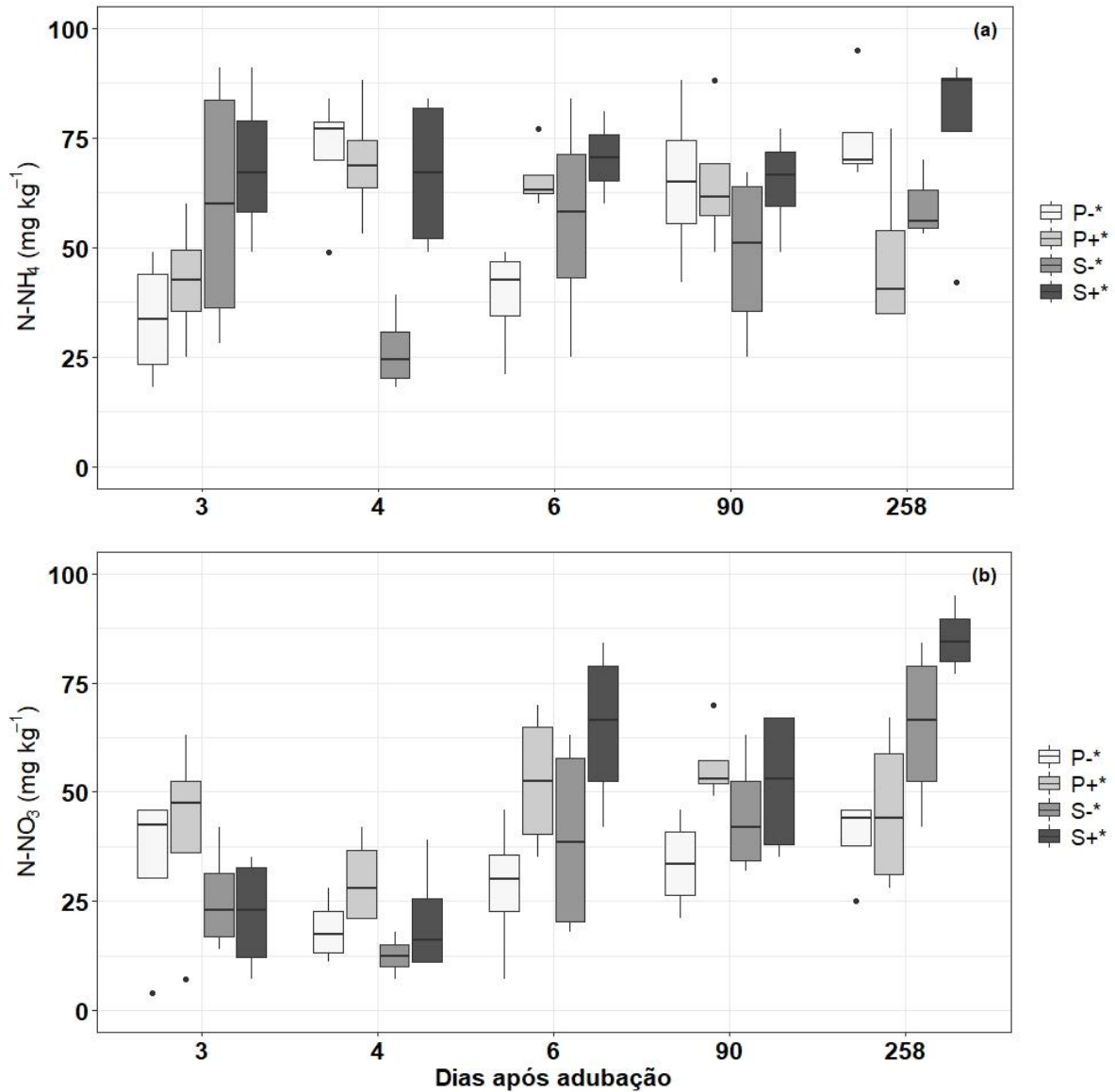
Embora no presente trabalho não foram encontradas correlações estatísticas entre os fatores analisados pela correlação de Pearson, os fluxos obtidos nos anos de 2017 e 2018 estão apresentados no Apêndice B (dados secundários disponibilizados).

4.6 Concentração de amônio e nitrato no solo sob os diferentes usos

Antes da adubação, as concentrações de amônio ($N-NH_4^+$) e nitrato ($N-NO_3^-$) no solo não diferiram entre as parcelas P-, S-, P+ e S+. Transcorridos 3 dias da adubação, as concentrações de $N-NH_4^+$ foram maiores no solo sob cana-de-açúcar (S-*/S+*) do que no solo sob na pastagem (P-*/P+*) ($p < 0,05$), sem diferenças estatísticas entre o manejo adubado e sem adubo (Figura 13a). No quarto dia do experimento, a concentração de $N-NH_4^+$ no solo sob pastagem (P-*/P+*) foi maior do que no solo sob cana-de-açúcar (S-*/S+*) ($p < 0,05$), e ainda, o valor de $N-NH_4^+$ na pastagem sem adubo (P-*) foi superior ao da cana-de-açúcar não adubada (S-*) ($p\text{-ajustado} < 0,01$), e no solo com cana-de-açúcar, a concentração de $N-NH_4^+$ foi maior na cana adubada (S+*) do que na cana sem adubação (S-*) ($p\text{-ajustado} < 0,05$). Depois de 6 dias do experimento, as concentrações de $N-NH_4^+$ foram maiores na pastagem e na cana-de-açúcar adubadas (P+* e S+*) do que no solo sob pastagem e cana-de-açúcar sem manejo (P-* e S-*) ($p < 0,05$).

Diferenças nas concentrações de $N-NO_3^-$ entre os tratamentos foram encontradas com 4, 6, 90 e 258 dias de experimento (Figura 13b). Transcorridos 4 dias da adubação, os valores de $N-NO_3^-$ foram maiores no solo sob pastagem (P-*/P+*) do que no solo sob cana-de-açúcar (S-*/S+*) ($p < 0,1$), sem diferenças entre os manejos com e sem adubo. No sexto dia que decorreu a adubação, as concentrações de $N-NO_3^-$ foram maiores em P+* e S+* comparado à P-* e S-* ($p < 0,05$). Após 90 dias do experimento, as concentrações de $N-NO_3^-$, na pastagem e na cana-de-açúcar, foram maiores sob o solo adubado (P+* e S+*) do que sob o solo sem manejo (P-* e S-*) ($p < 0,05$). Transcorridos os 258 dias, os valores de $N-NO_3^-$ foram maiores na cana-de-açúcar (S-*/S+*) do que na pastagem (P-*/P+*) ($p < 0,01$) e ainda, a concentração de $N-NO_3^-$ foi maior na cana-de-açúcar adubada (S+*) do que na pastagem adubada (P+*) ($p\text{-ajustado} < 0,05$).

Figura 13 - Box-plot das concentrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo sob pastagem subutilizada (P^*), pastagem intensiva (P^{+*}), cana-de-açúcar sem fertilizantes (S^*) e cana-de-açúcar com fertilizantes (S^{+*}), na camada de 0-10 cm, em 3, 4, 6, 90 e 258 dias transcorridos da adubação. (a) Concentração de N-NH_4^+ , (b) concentração de N-NO_3^- . Os valores foram representados em mg de N por kg de solo. As barras de erro representam o desvio padrão das médias ($n=16$) e os pontos pretos maciços representam *outliers*



5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da discussão foi dividido em subseções a fim de responder as principais hipóteses deste estudo. Assim, cada subseção tem início com uma hipótese destacada em itálico na forma de cabeçalho, seguida da sua respectiva discussão.

5.1 Resposta dos microrganismos nitrificadores à mudança do uso de solo e fertilização

Hipótese: Considerando que houve um aumento no fluxo de N_2O nas parcelas que receberam fertilizantes nitrogenados (BENTO, 2020), espera-se que a abundância de microrganismos nitrificadores seja mais elevada nas parcelas que receberam fertilizantes.

Não foram encontradas diferenças estatísticas na abundância de microrganismos responsáveis pela nitrificação, AOA e AOB, entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas tanto no solo sob pastagem como no solo sob cana-de-açúcar (Figura 6c-6f); portanto, não se confirmou a primeira hipótese deste estudo.

Esse fato leva a se cogitar que não há uma limitação populacional no processo de nitrificação, mas, provavelmente há uma limitação do nutriente em si, neste caso, o nitrogênio. Assim, quando a concentração de nitrogênio aumenta, organismos se beneficiam desse aumento para obtenção de energia (HALLIN et al., 2009; PROSSER et al., 2020), acarretando um aumento nas emissões de N_2O .

Alguns estudos apoiam essa possibilidade. Os processos de nitrificação, e, portanto, seus organismos envolvidos, são regulados pela disponibilidade de N-amônio no solo (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013; OUYANG et al., 2016), e embora o uso de fertilizantes nitrogenados aumente a disponibilidade de N no solo, há estudos que demonstraram que o número de cópias do gene *amoA* (AOA) não foi responsivo à aplicação de N no solo ou até diminuiu em solos ácidos (PARFITT et al., 2012; DI et al.; 2009). Da mesma forma foi demonstrado que a abundância da comunidade AOB pode não ser afetada pelo aumento de N em solos fertilizados (HALLIN et al.; 2009).

No atual estudo, não foram encontradas correlações entre as abundâncias das comunidades AOA e AOB e as concentrações de $N-NH_4^+$ no solo (Apêndice A). Este resultado corrobora com a hipótese de que nas parcelas onde não houve aplicação de fertilizantes houve uma limitação de nutrientes. E assim, as parcelas fertilizadas produziram mais N_2O , pois tiveram mais N a disposição para a atividade dos microrganismos oxidadores de amônio (AO).

Uma vez que a presença de comunidades associadas à nitrificação implica na emissão de N₂O quando em condições favoráveis de nitrificação, tal como sob o aumento do conteúdo de N pela aplicação de fertilizantes (DI et al., 2010; MEINHARDT et al., 2018; PROSSER et al., 2020), mesmo que correlações entre o gene *amoA*, de bactérias e arqueias e as concentrações de amônio no solo não sejam observadas (CASSMAN et al., 2019).

Por outro lado, o uso e cobertura do solo teve influência notável na abundância dos microrganismos. Esse fato é ilustrado pelo maior número de cópias de genes de *amoA* (bactérias e arqueias) na cana-de-açúcar do que na pastagem (Figura 6c-6f). Ressalta-se que tal diferença foi observada tanto no período pré como pós-fertilização (Figura 6c, 6d), indicando que o uso do solo teve influência maior no número de cópias de arqueias oxidadores de amônio do que a aplicação de fertilizantes. Embora a acidez do solo seja um dos principais fatores a favorecer abundância de comunidades AO (NICOL et al., 2008; DI et al., 2009), neste estudo não foram observadas diferenças no pH entre os solos sob pastagem e cana-de-açúcar (Tabela 3), e, portanto, este fator não explicaria a predominância de arqueias oxidadores de amônio na cana-de-açúcar.

Assim, as diferenças nas características intrínsecas entre as plantas na pastagem e na cana-de-açúcar seriam uma possível explicação para as variações nas abundâncias de organismos nitrificadores entre os usos do solo. As plantas interagem com a biota do solo por meio de suas raízes e traços fisiológicos, tal como a liberação de exsudatos, que por sua vez influenciam os processos relacionados à ciclagem de nutrientes (BARDGETT; MOMMER; de VRIES, 2014). A estratégia de uso de recursos pelas plantas também contribui para a determinação do recrutamento e abundância de organismos oxidadores de amônio, sendo que plantas “exploradoras” favorecerem o crescimento de populações AOA pela maior disponibilidade de N-inorgânico na raiz (THION et al., 2016).

Há ainda estudos que evidenciam a capacidade de gramíneas tropicais, tal como a *Brachiaria* spp, suprimirem ou reduzirem o processo de nitrificação no solo por inibidores da nitrificação biológica (SUBBARAO et al., 2009; FERNANDES et al., 2011). Estes inibidores são compostos orgânicos produzidos e liberados pelas raízes das plantas que agem inibindo a enzima monooxigenase da amônia (MOA) ou suprimindo as populações AOA e AOB (SUBBARAO et al., 2009). A capacidade da pastagem interferir na atividade ou na abundância dos microrganismos nitrificadores pode ter influenciado a menor abundância de genes relacionados à nitrificação no solo sob pastagem e consequente reduzida emissão de N₂O em relação à cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar poderia ser considerada uma planta com característica “exploradora” com relação à estratégia de uso do N pela capacidade da planta reter N-NH_4^+ no seu sistema radicular ou imobilizado na palha. De maneira que favoreceria o uso dessa forma de N pelos microrganismos em canaviais, explicando as maiores abundâncias de AOA e AOB nas parcelas de cana-de-açúcar fertilizadas do que nas parcelas de pastagem fertilizadas. É possível que o efeito do N residual no solo sob cana-de-açúcar fertilizada - proveniente das aplicações de fertilizantes nos anos anteriores à amostragem experimental - tenha beneficiado a maior proliferação de AOA e AOB na cana-de-açúcar comparado à pastagem, e de AOA antes da adubação também. Parte do conteúdo de N-amônio proveniente da fertilização nitrogenada é preservada no sistema radicular da cana-de-açúcar, favorecendo a produtividade da planta nas safras seguintes (VITTI et al., 2007) e podendo ser usado por microrganismos que tem o amônio como fonte preferencial de N para seus metabolismos (WONG et al., 2008). Dessa forma, o uso desta fonte de N pelos nitrificadores poderia ter contribuído com as maiores emissões de N_2O observados no solo sob cana-de-açúcar (BENTO, 2020).

Em adição, o sistema de colheita cana-crua favorece o acúmulo de palhada na superfície do solo sob cana-de-açúcar. Embora a palha da cana-de-açúcar tenha compostos recalcitrantes, ela serve como fonte de alimento para os microrganismos, que de maneira lenta realizam sua decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A decomposição da palha resulta na liberação de CO_2 e na medida que o C é liberado, há o favorecimento da mineralização do N no solo, elevando o fornecimento deste nutriente na cana-de-açúcar. Este aporte de N proveniente da palha pode favorecer as taxas de transformação do N tanto nas parcelas de cana-de-açúcar fertilizadas quanto nas não fertilizadas, isto explicaria as maiores emissões de N_2O na cana-de-açúcar em detrimento da pastagem, que não teve adição de material orgânico.

Um fator a ser considerado é a ausência do animal nas parcelas de pastagem, o que pode ter contribuído para os resultados obtidos neste estudo. As excreções do gado, sobretudo a excreção de urina, representam uma entrada de N no solo na forma de ureia. A ureia é transformada em amônia, que é o principal substrato usado pelos organismos nitrificadores (PROSSER; NICOL, 2012). Portanto, em pastagens com lotação de animal as taxas de transformação do N podem ser intensificadas pelo excremento do animal, com consequente aumento no potencial de emissão de N_2O via nitrificação.

Outra diferença importante entre as comunidades oxidadoras de amônio observada neste estudo, foi a maior abundância de arqueia do que as bactérias tanto na pastagem quanto na cana-de-açúcar. Essa tendência também foi encontrada por outros autores em solos sob cana-de-açúcar (HAYATSU et al., 2008) e em solos sob outros usos (TAGO et al., 2015;

RIGOTO et al., 2020). Não é simples explicar essa diferença observada nas populações de arqueias e bactérias. Contudo, as maiores populações de arqueia encontradas em ambientes de extremos do planeta, e em diferentes profundidades do solo, indicam uma maior versatilidade da arqueias oxidadores de amônio em relação às bactérias AOB (LEININGER et al., 2006; MARTENS-HABBENA; STIEGLMEIER; ALVES; SCHLEPER, 2014).

Neste estudo, dentro do domínio *Archaea*, a abundância relativa do filo Thaumarchaeota foi superior à 90% da comunidade de arqueias na pastagem e na cana-de-açúcar. Este resultado confirmaria a abundância da comunidade AOA, visto que o filo Thaumarchaeota abrange os organismos oxidadores de amônio (STIEGLMEIER; ALVES; SCHLEPER, 2014). Já o filo Euryarchaeota foi o segundo mais abundante e presente em todas as parcelas. Estes resultados sugerem que as arqueias no solo sob pastagem e sob cana-de-açúcar teriam papel importante no potencial de transformações biogeoquímicas que ocorrem nesse meio, pela diversidade de funções em que estes grupos estão envolvidos. Isto porque grande diversidade da comunidade de arqueias tem a capacidade de produzir metano em condições anaeróbias (CONRAD, 2002), enquanto outros grupos estão envolvidos na produção de N₂O (HAYATSU et al., 2008), sendo que o filo Euryarchaeota compreende organismos metanogênicos, que em condições favoráveis produzem mais de 70% das emissões de metano na Terra (LIU; WHITMAN, 2008).

Além disso, as capacidades de fixar nitrogênio e reduzir nitrato foram relatadas entre organismos Euryarchaeota (CABELLO et al., 2004; RAYMOND et al., 2004). A abundância superior de Thaumarchaeota em relação ao filo Euryarchaeota também foi encontrada em outros estudos em solos sob cultivo agrícola, pastagem, florestas e vegetações (HU et al., 2013, ARAUJO et al., 2018), indicando que a atividade predominante desempenhada por arqueias em solos seria a oxidação do amônio.

5.2 Resposta dos microrganismos desnitrificadores à mudança do uso de solo e fertilização

Hipótese: Considerando que houve um aumento no fluxo de N_2O nas parcelas que receberam fertilizantes nitrogenados (BENTO, 2020), espera-se que as abundâncias de microrganismos desnitrificadores sejam mais elevadas nas parcelas que receberam fertilizantes.

No presente estudo, não foram observadas variações na abundância dos genes desnitrificadores entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas para a pastagem e nem para a cana-de-açúcar (Figura 7). Portanto, a resposta de microrganismos relacionados à desnitrificação não foi afetada pelos fertilizantes, da mesma forma que não foi observado para os organismos nitrificadores. Este resultado contradiz a hipótese de que organismos desnitrificadores seriam mais abundantes nas parcelas que receberam aplicação de fertilizantes, e sugere que fatores relacionados a cobertura e uso do solo tiveram maior influência na abundância dos genes associados à desnitrificação. As condições de hipóxia, concentração de nitrogênio, umidade e textura do solo estão entre os principais fatores que influenciam no processo de desnitrificação (WRAGE et al., 2001; PIHLATIE et al., 2004; MORLEY; BAGS, 2010). Enquanto a distribuição e a diversidade de organismos desnitrificadores indicam ser influenciadas pelas condições de cultivo e uso do solo (HALLIN et al., 2009). No entanto, os impactos da fertilização na abundância de desnitrificadores ainda não são claros, devido à diversidade de organismos e metabolismos envolvidos nesse processo (PHILIPPOT; HALLIN; SCHLOTTER, 2007).

A concentração de $N-NO_3^-$ foi maior nas parcelas fertilizadas do que nas que não receberam fertilizantes, para o sexto e o nonagésimo dias após a fertilização (Figura 12b). As concentrações de nitrato no solo foram positivamente correlacionadas com as abundâncias de *nirK* e *nosZ* do clado I (Apêndice A). Embora correlações significativas não indiquem necessariamente uma relação de causa e efeito; essas correlações sugerem que a aplicação de fertilizantes nitrogenados poderia favorecer as taxas de transformação do N pelos organismos desnitrificadores a partir do aumento de NO_3^- nos solos. O maior conteúdo de nitrato no solo decorrente da aplicação de fertilizantes estimularia a desnitrificação, em meio a condições no solo que favoreçam a redução do nitrato ou do nitrito à N_2O ou N_2 , como a disponibilidade de matéria orgânica e água no solo (SMITH; McTAGGART; TSURUTA, 1997; GELFAND et al. 2015). Porém, como a abundância dos genes associados à desnitrificação não foi superior nas parcelas fertilizadas em relação às não fertilizadas, apenas o aumento da disponibilidade de N pela fertilização não necessariamente ocasionaria o

aumento da abundância dos desnitrificadores ou da desnitrificação, estando as taxas de transformação do N associadas a outros fatores no solo.

Além disso, como os teores de N total nos solos sob pastagem e cana-de-açúcar foi de aproximadamente 0,2% (Tabela 3) nas parcelas fertilizadas e não fertilizadas, isto significa que este nutriente não está ausente ou em baixa concentração (RONQUIM, 2010), mesmo nas parcelas que não receberam fertilizantes. Assim, o aporte adicional de N pela aplicação de fertilizantes pode não ter resultado em um aumento significativo na disponibilidade de N para estimular o crescimento das comunidades nitrificadoras ou desnitrificadoras nas parcelas fertilizadas. Este fator ajudaria a explicar por que não foram observadas variações nas abundâncias de organismos relacionados à nitrificação e à desnitrificação entre as parcelas que receberam fertilizantes e aquelas que não receberam, tanto na pastagem quanto na cana-de-açúcar.

Devido à ausência de diferença na abundância dos genes associados à desnitrificação entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas na pastagem e na cana-de-açúcar (Figura 7), talvez o estímulo das emissões de N₂O pela desnitrificação não estaria associado à abundância dos microrganismos desnitrificadores e sim às taxas de transformação provocadas pelo conteúdo de N no substrato. Portanto, a abundância ou presença dos genes associados às etapas de desnitrificação não refletiria necessariamente no aumento da atividade enzimática correspondente (RÖLING et al., 2007).

A abundância dos genes da desnitrificação associados às atividades da redutase de nitrito (*nirS*) e da redutase do óxido nitroso (*nosZ* clado I) foi aproximadamente duas vezes maior na pastagem do que na cana-de-açúcar, antes e depois da fertilização (Figura 7c, 7d, 7e, 7f). O mesmo padrão de resultado foi observado em outro estudo em solos tropicais (ARNALDO, 2014), que também constatou que as emissões de N₂O não diferiram entre os tipos de uso do solo. Portanto, a maior abundância de desnitrificadores no solo sob pastagem não foi um fator determinante para provocar maiores emissões N₂O neste uso do solo. Este achado confirmaria o resultado obtido no presente estudo, onde o solo sob cana-de-açúcar, que teve menor abundância de desnitrificadores, emitiu mais N₂O do que o solo sob pastagem, em condições de campo (BENTO, 2020). Assim, é possível que as taxas de redução do N poderiam estar limitadas não pela abundância de organismos desnitrificadores, mas pela entrada de N além de outros fatores no solo que propiciam a desnitrificação. Mesmo que as condições de cultivo e cobertura no solo tenham influenciado na abundância de desnitrificadores

Além disso, a abundância do gene *nirS* foi quatro ordens de grandeza menor que do gene *nirK*, também associado à redutase de nitrito; apesar disso, a abundância de *nirK* não foi afetada nem pelo uso nem pelo manejo do solo (Figura 7a, 7b). Apesar das diferenças na composição das enzimas Nir codificadas pelos genes *nirK* e *nirS* (ZUMFT, 1997), bactérias e fungos desnitrificadores que possuem o gene *nirK* ou *nirS* são responsáveis pela mesma etapa no processo de desnitrificação (HALLIN et al., 2009), que muitas vezes tem como produto final o gás N₂O, pois parte dos organismos que contém os genes *nir* não contém o gene *nosZ* (JONES et al., 2008), capaz de reduzir N₂O a N₂. Dessa forma, a maior abundância de *nirK* poderia influenciar as emissões de N₂O quando em condições favoráveis de abundância de N e ausência de oxigênio.

Dentre os fungos, no presente estudo, a predominância dos filos Ascomycota e Basidiomycota foi observada nos solos sob pastagem e cana-de-açúcar (Figura 9a, 9b). Além disso, observou-se a presença de gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* em proporções semelhantes entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas na pastagem e na cana-de-açúcar. Grande parte dos fungos com a capacidade de realizar desnitrificação pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota (SHOUN et al., 1992), sendo que o principal produto da desnitrificação fúngica é o óxido nitroso (WEI et al., 2014; MAEDA et al., 2015). Adicionalmente, em solos agrícolas que receberam a aplicação de fertilizante orgânico, grande parte das emissões de N₂O foram provenientes das atividades de desnitrificação por fungos (WEI et al., 2014). Portanto, se especula que a atividade de desnitrificação fúngica contribuiria com as emissões de N₂O nas parcelas fertilizadas de pastagem e cana-de-açúcar.

Neste estudo também foi encontrada na pastagem e na cana-de-açúcar uma maior proporção de microrganismos com o gene *nosZ* que pertencem ao clado II em relação aos que pertencem ao clado I. (Figura 7e-7h). Os cladogramas I e II além de representarem agrupamentos filogeneticamente distintos entre si do gene *nosZ* (JUHANSON et al., 2017) estão associados a diferentes funções (JONES et al., 2013). O clado I compreende o grupo que realiza a desnitrificação completa, agrupando principalmente proteobactérias e arqueias halófilas (JONES et al., 2013). O clado II do gene *nosZ* abrange uma maior diversidade de bactérias e arqueias do que o clado I (JONES et al., 2014). Em adição, os organismos com *nosZ* do clado II, em sua maioria, não possuem os genes *nirK* e *nirS*, e, portanto, não tem a capacidade de produzir N₂O, diferentemente dos organismos categorizados como clado I, que são capazes de realizar todas as etapas da desnitrificação (JUHANSON et al., 2017; JONES et al., 2014).

A maior diversidade e abundância do clado II estão associadas à menor produção de N_2O ou ao maior potencial de consumo desse gás (JONES et al., 2014; SAMAD et al., 2016). Também há constatações sobre a relação causal entre abundância de *nosZ* do clado II e o baixo potencial de emissão de N_2O (DOMEIGNOZ-HORTA et al., 2016). Portanto, é possível que haja mais produção de N_2 do que N_2O no processo de desnitrificação guiado por microrganismos *nosZ* pertencentes ao clado II (PHILIPPOT et al., 2011; GRAF; JONES; HALLIN, 2014). Fato de extrema importância, uma vez que N_2O é um potente GEE, enquanto N_2 é pouco reativo na natureza. Assim, mesmo que o solo sob cana-de-açúcar tenha maior potencial para produzir óxido nitroso em condições favoráveis, a atividade dos organismos desnitrificadores pertencentes ao clado II contribuiria para o consumo deste gás, diminuindo o potencial de emissão da cana-de-açúcar.

No presente estudo, a abundância relativa do filo *Proteobacteria*, não diferiu entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas, no entanto, foi mais abundante na pastagem do que na cana-de-açúcar, após a fertilização (Figura 8b). As proteobactérias, em sua maioria, são organismos desnitrificadores, incluindo também os grupos de bactérias nitrificadoras (HAYATSU et al., 2008), portanto, a composição e abundância destes organismos afetam os processos de desnitrificação e nitrificação (MILLER et al., 2008). Porém, considerando que as emissões de N_2O foram superiores nas parcelas fertilizadas, é possível sugerir que, assim como a abundância dos genes associados ao ciclo do nitrogênio, a composição da microbiota do solo tenha suas atividades limitadas pelo conteúdo de N no sistema.

5.3 Resposta da diversidade de microrganismos à mudança de uso do solo e fertilização

Hipótese: Considerando que os microrganismos do solo são os principais responsáveis pela ciclagem do nitrogênio, espera-se que as comunidades microbianas tenham suas diversidades reduzidas pela aplicação de fertilizantes na pastagem e na cana-de-açúcar.

Seria esperado que a aplicação de fertilizantes diminuiria a diversidade alfa de bactérias e fungos por seleção ou favorecimento de determinados grupos de microrganismos que usam os nutrientes de maneira mais eficiente (OUYANG et al., 2016; STALEY et al., 2018). No entanto, a diversidade alfa de bactérias e fungos nos solos sob pastagem e cana-de-açúcar não foi alterada significativamente com uso de fertilizantes (Figura 10b, 10d). Resultados semelhantes foram encontrados por Gou et al. (2019) e Cassman et al. (2019).

A conversão de pastagem em cana-de-açúcar mantém o sistema de cultivo homogêneo (monocultura), o que resultaria em padrões similares na diversidade alfa devido ao uso do solo (MENDES et al., 2015).

Por outro lado, a diversidade beta de bactérias e fungos variou de acordo com o uso do solo, tendo diferentes agrupamentos nos solos sob pastagem e sob cana-de-açúcar (Figura 11a, 11b). Este resultado indica, novamente, que o uso do solo e sua cobertura foram os principais fatores a influenciar a estrutura das comunidades microbianas antes da fertilização, sugerindo que a pastagem e a cana-de-açúcar recrutariam comunidades microbianas distintas entre si. Outro estudo também indicou que a diversidade beta de bactérias segrega de maneira distinta em solos sob pastagem e cana-de-açúcar (ARAÚJO, 2017).

A comunidade fúngica, sobretudo, tende a ser mais sensível aos efeitos da cobertura do solo, devido a dependência direta que os fungos têm de compostos de carbono liberados pelas plantas (GAO et al., 2013). Estudos mostram que por meio da liberação de compostos orgânicos e deposição de resíduos, as plantas têm efeitos específicos sobre a estrutura das comunidades microbianas do solo (THOMSON et al., 2010; WU et al., 2018). Devido aos efeitos diretos e indiretos da cobertura vegetal no ambiente edáfico, as espécies de plantas e suas diversidades são consideradas preditoras da diversidade microbiana nos solos (MITCHELL et al., 2012). Portanto, o uso e cobertura do solo seriam os principais fatores responsáveis pelos agrupamentos evidenciados na amostragem anterior à fertilização.

Após a fertilização, a diversidade beta de bactérias e fungos foi influenciada pela interação entre o uso do solo, o manejo de fertilizantes e o tempo decorrido após a fertilização (Figura 12). Este resultado sugere que a estrutura das espécies de bactérias e fungos estaria a médio-longo prazo se configurando não apenas em função do uso e cobertura do solo, mas também do uso de fertilizantes e de modificações sazonais nas populações microbianas ao longo do ano. Além da diversidade das comunidades microbianas ser influenciada por fatores edáficos e padrões biogeográficos (GREEN et al., 2004; FIERER; JACKSON, 2006; LAUBER et al., 2009; ROUSK et al., 2010), a distribuição dos microrganismos no solo é condicionada por variações espaço-temporal relacionadas à sazonalidade em curtos e longos períodos no tempo (GILBERT et al., 2010; SHIMADZU et al., 2013; STEVENSON; HUNTER; RHODES, 2014). Portanto, é possível que a variabilidade sazonal juntamente com o efeito da fertilização ao longo do tempo explicariam as variações na estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas na pastagem e na cana-de-açúcar.

A composição dos filos mais abundantes de bactérias e fungos não variou entre as parcelas fertilizadas e não fertilizadas (Figura 8b, 9b). Este resultado pode ser confirmado pelas abundâncias de arqueias, bactérias e fungos, que também não foram alteradas significativamente pela aplicação de fertilizantes, tanto no solo sob pastagem e quanto sob cana-de-açúcar (Figura 5). Porém, como foi observado para os genes associados às transformações do N, a abundância relativa dos grupos *Proteobacteria*, *Chloroflexi* e *Planctomycetes* variaram devido ao uso do solo. Portanto, a aplicação de fertilizantes não afetou a abundância relativa dos principais grupos de bactérias e fungos, mas o uso do solo pode ter influenciado a composição das comunidades microbianas, pelo favorecimento de grupos microbianos.

Microrganismos diazotróficos associativos além de contribuir com o crescimento das plantas, têm o importante papel na substituição do uso de fertilizantes nitrogenados químicos na agricultura (GALLOWAY et al., 2004). No presente trabalho não houve variação na abundância de *nifH* entre os usos do solo e o manejo (Figura 6a, 6b). Porém, o número de cópias do gene *nifH* foi de 10^6 , com valores maiores do que de outros grupos genes na transformação do N. Este resultado significa que a quantidade de N proveniente da fertilização não foi suficiente para causar o estímulo ou a redução dessas populações. Porém, a presença de organismos fixadores de N no solo poderia indicar a ocorrência de associações menos especializadas de diazotróficos de vida livre com pastagens e cana-de-açúcar, como já foi relatado em outros estudos (PERIN et al., 2006; MOREIRA et al., 2010). A atividade destes organismos é afetada pelo conteúdo de N decorrente da fertilização, sendo que as taxas de fixação biológica são inibidas pela deficiência de N ou reduzidas diante de altas concentrações resultantes da fertilização nitrogenada (SALVAGIOTTI et al., 2008; REIS JUNIOR et al., 2000). Dessa forma, o uso adequado da fertilização contribuiria para o favorecimento da atividade dos organismos diazotróficos, que por sua vez beneficiaria a produtividade das culturas pela fixação biológica do N_2 .

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que a conversão do uso do solo de pastagem para cana-de-açúcar foi o principal fator capaz de alterar a abundância e composição das comunidades microbianas do solo. Por outro lado, o uso de fertilizantes não indicou ser um fator determinante na modificação da abundância dos grupos de microrganismos associadas ao ciclo do nitrogênio, porém o conteúdo de N no solo indicou ser o principal fator limitante a influenciar as atividades destes grupos e consequentemente as emissões de N_2O nos solos.

A abundância de organismos nitrificadores foi maior no solo sob cana-de-açúcar enquanto a abundância de desnitrificadores foi maior no solo sob pastagem, sendo que o efeito da aplicação de fertilizantes não foi observado no tamanho destas populações. A quantidade de organismos associados à fixação biológica do nitrogênio não foi modificada pela conversão nem pela intensificação do uso do solo e o número de cópias observado sugere o mesmo potencial de fixação biológica do N na pastagem e na cana-de-açúcar.

A diversidade alfa de bactérias e fungos na pastagem e na cana-de-açúcar não foi alterada pela conversão de uso do solo nem pela aplicação de fertilizantes. Antes da aplicação, a diversidade beta de bactérias e fungos de fertilizantes foi influenciada sobretudo pelo uso e cobertura de solo, formando agrupamentos distintos entre os solos sob pastagem e cana-de-açúcar. Nas amostragens decorrentes da fertilização, a diversidade beta de bactérias e fungos teve suas variações influenciadas pela interação entre o uso solo, aplicação de fertilizantes e sazonalidade temporal na pastagem e na cana-de-açúcar.

As concentrações das formas de N-inorgânico foram variáveis no tempo para pastagem e cana-de-açúcar, sendo que o conteúdo de N-nitrato foi positivamente relacionado com a abundância de genes associados à desnitrificação.

A alta diversidade, dinâmica de atividades da comunidade microbiana assim como a velocidade em que o nitrogênio sofre modificações no solo podem ter sido os principais fatores limitantes na investigação dos efeitos da conversão pastagem-cana-de-açúcar e intensificação do solo no ciclo do nitrogênio. De maneira que as conclusões desse estudo são referentes aos momentos de amostragem em que as observações foram realizadas.

Futuros estudos que incluam mais genes envolvidos nos processos de transformação do N e que sejam realizados em condições controladas incluindo fontes de N marcadas poderiam contribuir na investigação dos agentes nas transformações do N na interface solo-planta-atmosfera e assim contribuir com a compreensão dos impactos da mudança de uso do solo e de

sua intensificação no ambiente. Estes estudos podem contribuir com o estabelecimento de práticas que favoreçam o melhor aproveitamento do N pelas plantas nos sistemas agrícolas com o auxílio da microbiota do solo, garantindo a sustentabilidade na produtividade agrícola.

Os resultados encontrados contribuíram para aprofundar os conhecimentos sobre a resposta das comunidades microbianas do solo à mudança de uso do solo, sugerindo que os microrganismos são mais sensíveis ao uso da terra do que ao efeito da fertilização. A alteração das comunidades microbianas do solo pode significar mudanças nos ciclos biogeoquímicos pelos quais são responsáveis. O que é de especial interesse para o Brasil, pois as emissões dos GEE são provenientes sobretudo das mudanças de uso da terra e agricultura. Assim, a compreensão sobre a microbiota do solo pode constituir alternativas para minimizar este cenário.

REFERÊNCIAS

- ALBRIGHT, M. B. N. et al. Comparative genomics of nitrogen cycling pathways in bacteria and archaea. **Microbial Ecology**, Cham, v. 77, p. 597-606, 2019.
- ANDRADE JUNIOR, M. A. U. de. et al. Exploring future scenarios of ethanol demand in Brazil and their land-use implications. **Energy Policy**, Guildford, v. 134, p. 1-12, 2019.
- ANEJA, V. P.; SCHLESINGER, W. H.; ERISMAN, J. W. Effects of agriculture upon the air quality and climate: research, policy, and regulations. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 43, n. 12, p. 4234-4240, 2009.
- ARAÚJO, M. V. F. **O impacto do manejo do cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) e de pastagem (*Brachiaria decumbens*) na microbiota do solo**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- ARAUJO, A. S. F. de. et al. Archaea diversity in vegetation gradients from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 522-528, 2018.
- ARNALDO, M. **Relações entre fluxos de óxido nitroso (N₂O) com umidade e genes associados à desnitrificação em floresta e sistemas agrícolas**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- BARDGETT, R. D.; MOMMER, L.; de VRIES, F. T. Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 29, n. 12, p. 692-699, 2014.
- BENTO, C. B. et al. Impacts of sugarcane agriculture expansion over low-intensity cattle ranch pasture in Brazil on greenhouse gases. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 206, p. 980-988, 2018.
- BENTO, C. B. **Impactos do manejo do solo em área de pastagem extensiva convertida em cultivo de cana-de-açúcar e em pastagem intensiva**. 2020. 94 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2020.
- BERGMAN, B. et al. Cytochrome oxidase: subcellular distribution and relationship to nitrogenase expression in the nonheterocystous marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 10, p. 3239-3244, 1993.
- BERKS, B. C. et al. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1232, n. 3, p. 97-173, 1995.
- BOMFIM, B. et al. Fire affects asymbiotic nitrogen fixation in southern Amazon forests. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, New York, v. 125, n. 2, p. 1-13, 2020.

BORDONAL, R. de O. et al. Changes in quantity and quality of soil carbon due to the land-use conversion to sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantation in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 240, p. 54-65, 2017.

BORDONAL, R. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 38, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>.

BÖRJESSON, P. Good or bad bioethanol from a greenhouse gas perspective – What determines this? **Applied Energy**, Amsterdam, v. 86, n. 5, p. 589-594, 2009.

BORTOLI, M. et al. Emissão de óxido nitroso nos processos de remoção biológica de nitrogênio de efluentes. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2012.

BOUWMAN, A. F. et al. Global trends and uncertainties in terrestrial denitrification and N₂O emissions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 386, p. 1-12, 2013.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 704 p.

BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: NORMAN, A. G. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 2 - Chemical and microbiological properties. Madison: ASA, 1965. p. 1149-1178. (Agronomy Monographs, 9).

BURFORD, R.; FRYZUK, M. D. Examining the relationship between coordination mode and reactivity of dinitrogen. **Nature Reviews Chemistry**, London, v. 1, n. 26, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0026>

BUTTERBACH-BAHL, K. et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 368, n. 1621, p. 1-13, 2013.

CABELLO, P.; ROLDÁN, M. D.; MORENO-VIVÍAN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology Society**, London, v. 150, n. 11, p. 3527–3546, 2004.

CALDARELLI, C. E.; GILIO, L. Expansion of the sugarcane industry and its effects on land use in São Paulo: Analysis from 2000 through 2015. **Land Use Policy**, Amsterdam, v. 76, p. 264-274, 2018.

CALLAHAN, B. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, London, v. 13, p. 581-583, 2016.

CALLAHAN, B.; MCMURDIE, P.; HOLMES, S. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, London, v. 11, p. 2639-2643, 2017.

CAMARGO, O. A. et al. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2009. 77 p. (Boletim Técnico, 106).

- CANISARES, L. P. et al. Soil microstructure alterations induced by land use change for sugarcane expansion in Brazil. **Soil Use and Management**, New York, v. 36, n. 2, p. 189-199, 2020.
- CAPORASO, J. G. et al. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Oxford, v. 18, p. 117-143, 1993.
- CARDOSO, E. J. B. N.; DINI ANDREOTE, F. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016. 221 p.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.
- CASSMAN, N. A. et al. Nitrification inhibitors effectively target N₂O-producing *Nitrosospora* spp. in tropical soil. **Environmental Microbiology**, New York, v. 21, n. 4, p. 1241-1254, 2019.
- CASSOL, G. V. et al. Raised seedbeds and irrigation increase the yield of soybean rotated with rice in lowland of Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 55, art. ID e01398, p. 1-8, 2020.
- CERRI, C. C. et al. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 831-843, 2009.
- CHERUBIN, M. R. et al. Soil quality indexing strategies for evaluating sugarcane expansion in Brazil. **Plos One**, San Francisco, 26 p. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150860>.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Segundo levantamento – Safra 2020/2021**, Brasília, DF, v. 7, n. 2, p. 1-64, 2020.
- CONRAD, R. Control of microbial methane production in wetland rice fields. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, London, v. 64, p. 59-69, 2002.
- COOKSON, W. R. et al. The influence of season, agricultural management, and soil properties on gross nitrogen transformations and bacterial community structure. **Australian Journal of Soil Research**, Clayton South, v. 44, n. 4, p. 453-465, 2006.
- DAMIAN, J. M. et al. Changes in soil phosphorus pool induced by pastureland intensification and diversification in Brazil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 703, n. 10, p. 1-12, 2020.
- DI, H. J. et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 621-624, 2009.
- DI, H. J. et al. Nitrous oxide emissions from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor, dicyandiamide, and relationships with ammonia-oxidizing bacteria and archaea. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 10, p. 943-954, 2010.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico de pastagens no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36 p.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 15, p. 211-216, 1961.

DÖBEREINER, J.; DE ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. de F. Avaliação da fixação do nitrogênio, em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.1, p. 233-237, 1966.

DOMEIGNOZ-HORTA, L. A. et al. Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria - an effective N₂O sink in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 103, p. 376-379, 2016.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 353 p.

FERNANDES, A. M. et al. Brachiaria species affecting soil nitrification. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 1699-1706, 2011.

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 4117-4120, 2005.

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

FOWLER, D. et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 368, n. 1621, p. 1-13, 2013.

FRANCIS, C. A. et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaeas in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, n. 41, p. 14683-14688, 2005.

FRANCO, A. L. C. et al. Loss of soil (macro)fauna due to the expansion of Brazilian sugarcane acreage. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 563-564, p. 160-168, 2016.

GALLOWAY, J. M. et al. The nitrogen cascade. **BioScience**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 341-356, 2003.

GALLOWAY, J. M. et al. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, The Hague, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004.

GALLOWAY, J. M. et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, New York, v. 320, n. 5878, p. 889-892, 2008.

GAO, C. et al. Host plant genus-level diversity is the best predictor of ectomycorrhizal fungal diversity in a Chinese subtropical forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 3403-3414, 2013.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 113-118, 1993.

GELFAND, I. et al. Short-term drought response of N₂O and CO₂ emissions from mesic agricultural soils in the US Midwest. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 212, p. 127-133, 2015.

GILBERT, J. A. et al. The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: a 'multi-omic' study of seasonal and diel temporal variation. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 1-17, 2010.

GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 9, n. 12, p. 597-605, 2004.

GOU, Q. et al. Plant-plant interactions and N fertilization shape soil bacterial and fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 128, p. 127-138, 2019.

GRAF, D. R. H.; JONES, C. M.; HALLIN, S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. **Plos One**, San Francisco, p. 1-20, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>.

GREEN, J. et al. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. **Nature**, London, v. 432, p. 747-750, 2004.

HALLIN, S. et al. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 597-605, 2009.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 60, p. 579-598, 2010.

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

HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 327-335, 2004.

HENRY, S. et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirG*, and *nosZ* genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 5181-5189, 2006.

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

HILL, T. C. J. et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2003.

HINK, L.; NICOL, G. W.; PROSSER, J. I. Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. **Environmental Microbiology**, New York, v. 19, n. 12, p. 4829-4837, 2017.

HOWARTH, R. W. Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 8, p. 14-20, 2008.

HU, H. W. et al. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 64, p. 18-27, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 47, p. 1-8, 2019. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf. Acesso em: 28 nov. 2020.

IPCC. **IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 214–309.

JONES, C. M. et al. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, p. 1955-1966, 2008.

JONES, C. M. et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. **The ISME Journal**, London, v. 7, p. 417-426, 2013.

JONES, C. M. et al. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 801-805, 2014.

JUHANSON, J. et al. Spatial and phyloecological analyses of *nosZ* genes underscore niche differentiation amongst terrestrial N₂O reducing communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 115, p. 82-91, 2017.

KAHINDI, J. H. P. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: The role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-base diversity studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. 1, 2013. doi: 10.1093/nar/gks808.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H. E. Microbial nitrate respiration: genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 104-117, 2011.

LA SCALA, N.; BOLONHEZI, D.; PEREIRA, G. T. Short-term soil CO₂ emission after conventional and reduced tillage of a no-till sugar cane area in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 244-248, 2006.

LAMMEL, D. R. et al. C and N stocks are not impacted by land use change from Brazilian Savanna (Cerrado) to agriculture despite changes in soil fertility and microbial abundances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 180, n. 4, p. 436-445, 2017.

LAPOLA, D. M. et al. A. Indirect land-use changes can overcome carbon savings from biofuels in Brazil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 23, n. 8, p. 3388-3393, 2010.

LAUBER, C. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, p. 5111-5120, 2009.

LAUGHLIN, R. J. et al. Evidence that fungi can oxidize NH_4^+ to NO_3^- in a grassland soil. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 285-291, 2008.

LEIGH, J. A. Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective. **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, UK, v. 2, n. 4, p. 125-131, 2000.

LEININGER, S. et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 422, n. 7104, p. 806-809, 2006.

LISIEUX, T. de. **História de uma alma**: manuscritos autobiográficos / Santa Teresa do Menino Jesus e da Sagrada Face. 24. ed. São Paulo: Paulus Editora, 2005.

LIU, Y.; WHITMAN, W. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, n. 1, p. 171-189, 2008.

LOPES, L. D.; FERNANDES, M. F. Changes in microbial community structure and physiological profile in a kaolinitic tropical soil under different conservation agricultural practices. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 152, p. 1-10, 2020.

LOURENÇO, K. S. et al. *Nitrosospira* sp. govern nitrous oxide emissions in a tropical soil amended with residues of bioenergy crop. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1-11, 2018.

LUZ, F. B. da. et al. Monitoring soil quality changes in diversified agricultural cropping systems by the Soil Management Assessment Framework (SMAF) in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 281, p. 100-110, 2019.

MAEDA, K. et al. N_2O production, a widespread trait in fungi. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 9697, p. 1-7, 2015.

MAHMUD, K. et al. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants**, Basel, v. 9, n. 1, n. 97, p. 1-17, 2020.

MARTENS-HABBENA, W. et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. **Nature**, London, v. 461, p. 976-979, 2009.

MARTENS-HABBENA, W.; STAHL, D. A. Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. **Methods in Enzymology**, New York, v. 496, p. 465-487, 2011.

MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Balance between food production, biodiversity and ecosystem services in Brazil: a challenge and an opportunity. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 21–25, 2009.

MARTINEZ-ARBIZU, P. **pairwiseAdonis**: Pairwise multilevel comparison using adonis. version 0.4. New York: CRAN Org., 2020. Disponível em: <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis>. Acesso em: 20 set. 2020.

MAZZETTO, A. M. et al. Comparing how land use change impacts soil microbial catabolic respiration in Southwestern Amazon. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 63-72, 2016.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

MEINHARDT, K. A. et al. Ammonia-oxidizing bacteria are the primary N₂O producers in an ammonia-oxidizing archaea dominated alkaline agricultural soil. **Environmental Microbiology**, New York, v. 20, n. 6, p. 2195-2206, 2018.

MENDES, L. W.; BROSSI, M. J. L.; KURAMAE, E. E.; TSAI, S. M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 95, p. 151-160, 2015.

MILLER, M. N. et al. Crop residue influence on denitrification, N₂O emissions and denitrifier community abundance in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 10, p. 2553-2562, 2008.

MITCHELL, R. J. et al. Explaining the variation in the soil microbial community: do vegetation composition and soil chemistry explain the same or different parts of the microbial variation? **Plant and Soil**, The Hague, v. 351, p. 355-362, 2012.

MONTEIRO, R. A. et al. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; da SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; de CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, Piauí, v. 2, n. 2, p. 74-99, 2010.

MORLEY, N.; BAGGS, E. M. Carbon and oxygen controls on N₂O and N₂ production during nitrate reduction. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1864-1871, 2010.

NELSON, M. B.; MARTINY, A. C.; MARTINY, J. B. H. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 113, n. 29, p. 8033-8040, 2016.

- NICOL, G. W. et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 2966-2978, 2008.
- NORTON, J.; OUYANG, Y. Controls and Adaptive Management of Nitrification in Agricultural Soils. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-18, 2019.
- OKSANEN, J. et al. **Vegan**: Community Ecology Package. New York: CRAN Org., 2013. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=vegan>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- OUYANG, Y. et al. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 96, p. 4-15, 2016.
- PARFITT, R. L. et al. Effect of nitrogen fertilizer on nitrogen pools and soil communities under grazed pastures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 55, p. 217-233, 2012.
- PERIN, L. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, 2006.
- PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SCHLOTTER, M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. **Advances in Agronomy**, Amsterdam, v. 96, p. 249-305, 2007.
- PHILIPPOT, L. et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, Oxford, v. 17, p. 1497-1504, 2011.
- PIHLATIE, M. et al. Contribution of nitrification and denitrification to N₂O production in peat, clay and loamy sand soils under different soil moisture conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 70, p. 135-141, 2004.
- POLY, F. et al. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 5, p. 2255-2262, 2001.
- PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidiser in soil: the quest for niche specialization and differentiation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, p. 523-531, 2012.
- PROSSER, J. I. et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. **Global Change Biology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 103-118, 2020.
- RAES, J. Crowdsourcing Earth's microbes. **Nature**, London, v. 551, p. 446-447, 2017.
- RAYMOND, Y. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 541-554, 2004.

RAZON, L. Reactive nitrogen: A perspective on its global impact and prospects for its sustainable production. **Sustainable Production and Consumption**, Amsterdam, v. 15, p. 35-48, 2018.

REGAN, K. et al. Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in an unfertilized grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 109, p. 214-226, 2017.

REIS JUNIOR, F. B. dos. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 219, p. 153-159, 2000.

RIGOTTO, A. et al. Shifting abundances of communities associated with nitrogen cycling in soils promoted by sugarcane harvest systems. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 71, n. 5, p. 444-450, 2020.

RÖLING, W. F. M. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biochemical fluxes by population size and cellular activity. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 62, p. 202-210, 2007.

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 27 p.

ROTHAUWE, 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, DC, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 1340-1351, 2010.

RÜTTING, T. et al. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. **Biogeosciences**, New York, v. 8, n. 7, p. 1779-1791, 2011.

SALVAGIOTTI, F. et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.

SAMAD, S. et al. Response to nitrogen addition reveals metabolic and ecological strategies of soil bacteria. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 26, p. 5500-5514, 2017.

SCHLEPER, C.; NICOL, G. W. Ammonia-Oxidising Archaea – Physiology, Ecology and Evolution. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 57, p. 1-41, 2010.

SHCHERBAK, I.; MILLAR, N.; ROBERTSON, G. P. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N₂O) emissions to fertilizer nitrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 111, n. 25, p. 9199-9204, 2014.

- SHIMADZU, H. et al. Diversity is maintained by seasonal variation in species abundance. **BMC Biology**, London, v. 11, p. 1-9, 2013.
- SHOUN, H.; KIM, D. H. et al. Denitrification by fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 94, p. 277-282, 1992.
- SMITH, K. A.; McTAGGART, I. P.; TSURUTA, H. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. **Soil Use and Management**, New York, v. 13, n. 4, p. 296-304, 2007.
- SOUZA, A. de. et al. Análise da relação entre O₃, NO e NO₂ usando técnicas de regressão linear múltipla. **GEOgraphia**, Niterói, v. 20, n. 43, 2018.
- STALEY, C.; BREUILLIN-SESSOMS, F.; WANG, P.; KAISER, T. Urea Amendment Decreases Microbial Diversity and Selects for Specific Nitrifying Strains in Eight Contrasting Agricultural Soils. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1-13, 2018.
- STEVENSON, B.A.; HUNTER, D. W. F.; RHODES, P. L. Temporal and seasonal change in microbial community structure of an undisturbed, disturbed, and carbon-amended pasture soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 175-185, 2014.
- STEVENSON, F. J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F. J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA; SSSA, 1982. (Agronomy Monographs, 22).
- STIEGLMEIER, M.; ALVES, R. J. E.; SCHLEPER, C. The Phylum Thaumarchaeota. In: ROSENBERG, E. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. Berlin: Springer, 2014. p. 347-362.
- SUBBARAO, G. V. et al. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, n. 41, p. 17302-17307, 2009.
- SUTTON, M. et al. Too much of a good thing. **Nature**, London, v. 472, p. 159-161, 2011.
- TAGO, K. et al. Environmental factors shaping the community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in sugarcane field soil. **Microbes and Environments**, Ibaraki, Japan, v. 30, n. 1, p. 21-28, 2015.
- TAVANTI, R. F. R. et al. What is the impact of pasture reform on organic carbon compartments and CO₂ emissions in the Brazilian Cerrado? **CATENA**, Amsterdam, v. 194, p. 1-11, 2020.
- THION, C. E. et al. Plant nitrogen-use strategy as a driver of rhizosphere archaeal and bacterial ammonia oxidiser abundance. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 92, n. 7, p. 1-11, 2016.
- THOMSON, B; C. et al. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. **Microbial Ecology**, Cham, v. 59, p. 335-343, 2010.
- TIAN, H. et al. Global soil nitrous oxide emissions since the preindustrial era estimated by an ensemble of terrestrial biosphere models: Magnitude, attribution, and uncertainty. **Global Change Biology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 640-659, 2019.

TILMAN, D. et al. Beneficial Biofuels-The food, energy, and environment trilemma. **Science**, New York, v. 235, p. 270–271, 2009.

TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 17, p. 170-178, 1996.

UNITE COMMUNITY. **Full UNITE+INSD dataset for Fungi**. Version 18.11.2018. Tartu, Estonia: UNITE Community, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15156/BIO/786347>. Acesso em: 30 mar. 2018.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 927-936, 2000.

VAN RAIJ, B. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas, Instituto Agrônomo; FUNDAG, 1997. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

VITOUSEK, P. M. et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 7, p. 737-750, 1997.

VITTI, A. C. et al. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 2, p. 249-256, 2007.

XU, H. et al. Characterization of fungal *nirK*-containing communities and N₂O emission from fungal denitrification in arable soils. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-12, 2019.

WANG, J. et al. Global analysis of agricultural soil denitrification in response to fertilizer nitrogen. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 616-617, p. 908-917, 2018.

WEI, W. et al. N₂O emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications or organic fertilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 69, p. 157-167, 2014.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WONG, M. S. et al. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. **Metabolic Engineering**, Brugge, Belgium, v. 108, p. 10:97, 2008.

WRAGE, N. et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 12-13, p. 1723-1732, 2001.

WU, S. H. et al. The aboveground vegetation type and underground soil property mediate the divergence of soil microbiomes and the biological interactions. **Microbial Ecology**, Cham, v. 75, p. 434-446, 2018.

YANG, T.; SIDDIQUE, K. H. M.; LIU, K. Cropping systems in agriculture and their impact on soil health-A review. **Global Ecology and Conservation**, Amsterdam, v. 23, p. 1-13, 2020.

YANG, X. Y. et al. Potential contribution of anammox to nitrogen loss from paddy soils in southern China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 81, n. 3, p. 938-947, 2015.

YONEYAMA, T. et al. Molecular Analyses of the Distribution and Function of Diazotrophic Rhizobia and Methanotrophs in the Tissues and Rhizosphere of Non-Leguminous Plants. **Plants**, Basel, v. 8, n. 10, p. 408, 2019. doi: 10.3390/plants8100408.

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 61, p. 533-536, 1997.

APÊNDICES

Apêndice A

Correlação de Pearson mostrando os valores da correlação (r) e do p -valor entre as abundâncias dos genes 16S rRNA (*Bacteria* e *Archaea*), ITS de fungos, *amoA* (*Bacteria* e *Archaea*), *nirS*, *nirK*, *nifH*, *nosZ* (clados I e II) (número de cópias do gene por grama de solo seco) e os valores de concentrações de amônio (N-NH₄⁺) e nitrato (N-NO₃⁻) do solo sob pastagem subutilizada (P-/P-*), pastagem intensiva (P+/P+*), cana-de-açúcar sem fertilizante (S-/S-*) e cana-de-açúcar com fertilizante (S+/S+*), na camada de 0-10 cm. As análises de relações foram geradas a partir das amostragens realizadas previamente e posteriormente à fertilização (aos 4, 6, 90 e 139 dias decorridos da adubação). Os valores de p -valor estatisticamente significativos ($\leq 0,05$) foram destacados em negrito

Genes	N-NH ₄ ⁺		N-NO ₃ ⁻	
	r	p -valor	r	p -valor
16S rRNA <i>Archaea</i>	-0,062	0,634	0,061	0,642
16S rRNA <i>Bacteria</i>	0,053	0,688	0,258	0,047
ITS fungos	0,042	0,749	0,127	0,335
<i>nifH</i>	-0,131	0,320	0,100	0,447
<i>amoA</i> <i>Archaea</i>	-0,149	0,255	-0,090	0,494
<i>amoA</i> <i>Bacteria</i>	-0,083	0,529	0,098	0,458
<i>nirK</i>	0,097	0,461	0,368	0,004
<i>nirS</i>	0,042	0,752	0,179	0,172
<i>nosZ</i> - clado I	0,021	0,873	0,338	0,008
<i>nosZ</i> - clado II	-0,100	0,449	0,160	0,222

Apêndice B

Fluxos de óxido nitroso (N₂O - mg m⁻¹ dia⁻¹) nos tratamentos referente às amostragens realizadas entre os anos de 2017 e 2018 (dados secundários)

	Média	Máximo (N ₂ O mg m ⁻¹ dia ⁻¹)	Mínimo
Pastagem extensiva subutilizada			
2017-2018	0,09 ± 0,03*	1,16	-0,25
Pastagem intensiva			
2017-2018	0,14 ± 0,04	1,57	-0,21
Cana-de-açúcar sem fertilizantes			
2017-2018	0,16 ± 0,03	0,90	-0,23
Cana-de-açúcar com fertilizantes			
2017-2018	0,56 ± 0,11	4,50	-0,11

Nota: *média ± erro padrão.