

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

Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar

Marcio Morais

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcio Morais
Engenheiro Agrônomo

Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição
de Plantas

Piracicaba

2008

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

Morais, Marcio
Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar / Marcio Moraes. - -
Piracicaba, 2008.
88 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Análise multivariada 2. Biodiversidade 3. Cana-de-açúcar 4. Fertilizantes
nitrogenados 5. Microbiologia do solo 6. Sequenciamento genético I. Título

CDD 633.61
M827d

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

OFEREÇO

À Deus, pelo dom da vida

Aos meus pais João e Izilda, por todo carinho, amor e apoio em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À São Judas Tadeu, pelo exemplo de bondade e fé.

Ao Professor Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, dedicação e amizade.

À ESALQ, em especial ao Programa de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pelo aperfeiçoamento e oportunidades de realização desse trabalho.

Aos meus avós Adão e Maria, pelo amor e carinho dedicados.

Aos meus irmãos Paula Renata e Igor e minha futura esposa Liliana, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Rafael, Adriano, Lucas, Pablo, Gisele, Giselle (Uai), Christie, Marcela e Henrique (KCT), pelas ajudas práticas e trocas de conhecimento.

Aos amigos Cesar (Alemão), Ademir (Prema), William (Xico) e Sandro (Construção), pelas palavras de apoio.

À todos os colegas do laboratório de microbiologia molecular, pelos momentos agradáveis.

À Gloriosa República Mansão Castelo COVIL e todos seus moradores, local onde fiz amigos que ficarão para toda vida.

MUITO OBRIGADO.

“Não te rendas no desânimo e insiste no bem.
Guardas contigo a possibilidade do limite,
mas Deus tem a possibilidade do impossível”

EMMANUEL

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1.1 Cultivo da cana-de-açúcar	11
2.1.2 Diversidade microbiana no solo	13
2.1.3 Métodos utilizados para determinação da diversidade microbiana do solo	15
2.1.4 Bactérias oxidadoras de amônio (AOB)	20
2.2 OBJETIVOS	24
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.3.1 Áreas experimentais e instalação dos experimentos.....	24
2.3.1.1 Experimento 1	24
2.3.1.2 Experimento 2	25
2.3.1.2.1 Usina São Luiz (USL – Pirassununga).....	26
2.3.1.2.2 Usina Santa Adélia (USA – Jaboticabal)	26
2.3.2 Amostragem	26
2.3.3 Determinações.....	27
2.3.3.1 Análise dos atributos químicos do solo	27
2.3.3.2 Biomassa microbiana	28
2.3.3.2.1 Carbono da biomassa microbiana (CBM)	28
2.3.3.2.2 Nitrogênio na Biomassa Microbiana (NBM)	29
2.3.3.3 Diversidade metabólica (Biolog)	29
2.3.3.4 Análises da estrutura das comunidades de <i>Bacteria</i> por PCR-DGGE	32
2.3.3.4.1 Extração do DNA total do solo	32
2.3.3.4.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S.....	32
2.3.3.4.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	33
2.3.3.4.4 Análise de comunidades de Bactérias oxidadoras de amônio (AOB) através do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S	34

2.3.3.4.5.1 Seleção das amostras	34
2.3.3.4.5.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S.....	34
2.3.3.4.5.3 Purificação dos <i>amplicons</i>	35
2.3.3.4.5.4 Clonagem dos <i>amplicons</i> do gene rRNA 16S	35
2.3.3.4.5.5 Extração do DNA plasmidial.....	36
2.3.3.4.5.6 Seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S	37
2.3.5 Análises estatísticas	37
2.4 Resultados e Discussão	39
2.4.1 Experimento 1	39
2.4.1.1 Produção de colmos por hectare	40
2.4.1.2 Atributos químicos do solo	41
2.4.1.3 Biomassa microbiana	42
2.4.1.4 Diversidade metabólica da microbiota	44
2.4.1.5 Análises por métodos multivariados.....	46
2.4.1.6 Estrutura das comunidades microbianas.....	48
2.4.2 Experimento 2.....	51
2.4.2.1 Produção de colmos por hectare	52
2.4.2.3 Biomassa microbiana do solo	54
2.4.2.4 Estrutura das comunidades microbianas.....	59
2.4.2.5 Análises por métodos multivariados.....	65
2.4.2.6 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de amônio (AOB)	69
3 CONCLUSÕES.....	76
3.1 Experimento 1	76
3.2 Experimento 2.....	76
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada do planeta. A atividade agrícola leva a uma redução da biodiversidade do solo e a menor diversidade microbiana pode resultar na diminuição da ciclagem de nutrientes e no crescimento das plantas. Como forma de avaliar alterações na atividade microbiana e na estrutura das comunidades de bactérias do solo, decorrentes do cultivo da cana-de-açúcar, foram conduzidos dois experimentos. O primeiro, no município de Novo Horizonte (SP), com o objetivo de determinar ação da queima da cana-de-açúcar sobre a comunidade de bactérias do solo e o segundo experimento, nos municípios de Pirassununga (SP) e Jaboticabal (SP), com o objetivo de verificar o efeito da adubação nitrogenada sobre a comunidade bacteriana do solo. Amostras de terra foram coletadas nas profundidades 0-10 e 10-20 cm, na linha e entrelinha de plantio. No primeiro experimento foram utilizadas três cultivares de cana-de-açúcar (SP81-3250, SP80-1842 e RB72-454) sob os sistemas de manejo de colheita sem queima (mecanizada) e com queima (manual) prévia a colheita. Nesse experimento foram avaliadas a diversidade metabólica (Biolog) e a estrutura das comunidades bacterianas por meio da PCR-DGGE do gene rRNA 16S. A mudança no manejo de colheita da cana-de-açúcar provocou modificações no metabolismo heterotrófico do solo, alterando a diversidade metabólica. No entanto, não houve mudanças na estrutura das comunidades bacterianas do solo com e sem queima sob a variedade SP801842. Dessa forma, a primeira queima da cana-de-açúcar previamente à colheita alterou a capacidade e a diversidade metabólica microbiana, mas não mudou a estrutura das comunidades de bactérias em relação à área sem queima. No segundo experimento foram avaliadas amostras de terra, de duas áreas experimentais, sob cultivo de cana-de-açúcar (SP81-3250), com diferentes doses de N (0, 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹) na forma de uréia, aplicadas no sulco de plantio. Para verificar possíveis alterações na comunidade bacteriana desses solos, foram avaliadas a estrutura das comunidades bacterianas por PCR-DGGE e a diversidade de bactérias oxidadoras de amônio (AOB), pelo seqüenciamento de bibliotecas do gene rRNA 16S, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. As doses de N alteraram a estrutura das comunidades bacterianas do solo nas duas áreas experimentais, determinadas por PCR-DGGE, entretanto, a adubação nitrogenada não alterou a diversidade de AOB no solo, das duas áreas. A estrutura da comunidade de AOB no solo da USA, sem adubação nitrogenada e com 80 kg de N ha⁻¹ diferiu estatisticamente. Nas duas áreas, as unidades taxonômicas operacionais mais abundantes se relacionam filogeneticamente a *Nitrosospora multiformes*.

Palavras-chave: PCR-DGGE; AOB; seqüenciamento; nitrogênio; rRNA 16S; Biolog; análises multivariadas; *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Soil bacterial diversity under sugarcane field

The microorganisms are the most abundant and diverse living creatures on earth. The agricultural practices reduce the soil biodiversity and a lower microbial diversity can result in a nutrient cycling and plant growth reduction. Two sugarcane crops experiments were investigated to evaluate modifications in the microbial activity and soil bacterial communities structure. The first of them was done at municipality of Novo Horizonte, Sao Paulo State (SP), and it has the aim to determine the sugarcane burn effects on soil bacterial community. The second experiment was introduced at municipalities of Pirassununga (SP) and Jaboticabal (SP) with the objective to verify the nitrogen fertilizing effect on soil bacterial community. The soil samples were taken in 0-10 cm and 10-20 cm depth, between and in the planting furrows. We used three sugarcane varieties (SP81-3250, SP80-1842 e RB72-454) in the first experiment under unburned and burned sugarcane pre-harvest. We evaluated metabolic diversity (Biolog) and the bacterial community structure performing PCR-DGGE of 16S rRNA gene in the first experiment. The sugarcane harvest management had modified the soil heterotrophic metabolism by altering its diversity. In spite of that, there is no difference between the burned and unburned soil bacterial communities under the variety SP80-1842. For that reason, the first year pre harvest burn altered the microbial metabolic diversity and capacity but did not change the bacterial community structure when related with unburned area. In the second experiment, soil samples under the SP81-3250 variety were analyzed from two sites. Each site received different levels of urea as nitrogen fertilization (0, 40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹) applied at planting furrows. The PCR-DGGE was applied to verify changes in the bacterial communities structure in these soils. The ammonia-oxidizing bacteria (AOB) diversity was evaluated by sequencing of 16S rRNA gene libraries after the amplification with specific primers. The levels of nitrogen fertilization altered the soil bacterial communities structure in both study sites, by PCR-DGGE evaluation. However, the nitrogen application did not alter the soil AOB diversity in those two sites. The soil AOB community structure under no nitrogen and 80 kg N ha⁻¹ application was different from the community structure under the other levels of fertilization in one of the two sites. The operational taxonomic unit are phylogenetically related to *Nitrosospira multiformes* in the two sites.

Keywords: PCR-DGGE; AOB; sequencing; nitrogen; 16S rRNA; Biolog; multivariate analysis; *Saccharum* spp.

1 INTRODUÇÃO

O manejo do solo e de sua cobertura vegetal reflete-se em suas características físicas, químicas e biológicas. Se por um lado existe hoje uma enorme área no país dedicada à monocultura, especialmente para as lavouras de soja, milho e cana-de-açúcar, onde se vislumbra a máxima produtividade baseada no uso de insumos químicos, há, por outro, um apelo emergente ao desenvolvimento de uma agricultura capaz de utilizar os recursos naturais de forma mais conservacionista.

A atividade agrícola leva a uma redução da biodiversidade, resultado da transição de área natural, com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio ecológico dinâmico, para área agrícola, com reduzido número de espécies (COUTINHO, 1999).

Porém, como a diversidade biológica dos solos é afetada ainda é assunto controverso. Há necessidade de compreendermos como a biodiversidade dos solos é afetada pela agricultura, em suas diversas formas. Em virtude de os microrganismos estarem na base da cadeia trófica e intrinsecamente associados aos diversos processos ecológicos do solo, além de responderem rapidamente às alterações impostas ao ambiente (BUNEMANN; SCHWENKE; VAN ZWIETEN, 2006), a diversidade microbiana têm potencial para ser usada como indicador de qualidade do solo.

Durante muito tempo foi bastante limitada a capacidade de se realizar estudos sobre a diversidade de microrganismos dos solos, já que uma pequena porcentagem (1% a 5%, aproximadamente), podia ser acessada pelos métodos convencionais, com base em cultivo (TORVISK; GOKSOYR; DAAE, 1990). Uma nova perspectiva surgiu com o desenvolvimento de métodos moleculares e bioquímicos mais sensíveis, que tem permitido interpretar mais facilmente e de forma mais sensível a diversidade genética e funcional dos microrganismos no solo (ZILLI et al., 2003).

A análise da diversidade metabólica utilizando placas Biolog e da estrutura de comunidades microbianas por meio de técnicas moleculares, como a PCR-DGGE e seqüenciamento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (gene rRNA 16S) têm se tornado cada vez mais difundidas, tornando-se uma ferramenta útil no monitoramento de mudanças ambientais em função dos diferentes usos da terra.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Cultivo da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool, com uma produção estimada de 579,8 milhões de toneladas na safra 2008/2009 (CONAB, 2008). O aumento na extensão das áreas cultivadas tem sido estimulado pelo fato de o etanol produzido ser um combustível alternativo. Dessa área ocupada pela cultura, a maior parte ainda sofre a prática da queima da palha para facilitar e baratear a colheita manual. A queima pode provocar periodicamente interferências nos ecossistemas, tanto dentro como junto às lavouras canavieiras, além de gerar intensa poluição atmosférica, a qual é prejudicial à saúde e afeta não apenas as áreas rurais adjacentes, mas também os centros urbanos mais próximos (SZMRECSÁNYI, 1994). De acordo com o Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC (1995), além do CO₂, são produzidos outros gases durante a queima de material vegetal como N₂O, NO_x, CO e CH₄, que também são responsáveis pelo efeito estufa e contribuem para o aquecimento global.

Em razão da poluição, na forma de gases (fumaça) e fuligem, causada pela queima, o interesse em evitar a queima do canavial previamente à colheita vem crescendo (CANÇADO et al., 2006). Além disso, no manejo de colheita sem queima, o C que seria emitido fica retido na palhada e no solo. Pelos processos de decomposição microbiana do material orgânico, parte deste C volta à atmosfera, mas de forma mais lenta e gradual, o que permite o aumento do estoque de C no solo ao longo dos anos. Esse acúmulo de matéria orgânica pode aumentar a retenção de água e a resistência a variações de temperatura do solo, melhorar sua estrutura e porosidade, além de constituir um reservatório de nutrientes minerais. Assim, os dois sistemas de manejo de colheita podem resultar em produtividades diferentes, pelo fato de haver maior aporte de matéria orgânica no sistema sem queima.

A colheita da cana-de-açúcar sem a queima prévia da palha vem sendo empregada de modo intensivo e com resultados positivos há vinte anos na Austrália (WOOD, 1991). No Brasil, em experimento realizado em Cruangi (PE), Urquiaga et al. (1991) verificaram que a média de produtividade de cinco soqueiras de cana-de-açúcar sem queima (67 t ha⁻¹),

superou em 10% à da cana-de-açúcar com queima, e nos anos mais secos ou quando a distribuição de chuvas foi muito irregular, o sistema sem a queima foi 25% superior. Das 74 t ha⁻¹ de matéria seca de palha depositada na superfície do solo, 8 % permaneceu como resíduo, porém, no sistema com queima apenas 1 % permaneceu no solo. Esses resultados indicam que 81% da palha foi degradada e, possivelmente, mineralizada pelos microrganismos do solo sem queima, evidenciando que o processo foi relativamente rápido naquelas condições.

A produção de palha de um canavial sob colheita mecanizada (sem queima), que inclui as folhas, as bainhas e o ponteiro, além de quantidade variável de pedaços de colmo, pode variar de 10 a 30 t ha⁻¹ de matéria seca. Esse material contém de 40 a 80 kg de N ha⁻¹, potencialmente disponíveis à cultura após mineralização pelos microrganismos do solo (ABRAMO FILHO et al., 1993; TRIVELIN; VICTORIA; RODRIGUES, 1995; TRIVELIN; RODRIGUES; VICTORIA, 1996; OLIVEIRA et al., 1999). Trivelin, Victoria e Rodrigues (1995) observaram que mais da metade dos 267 kg de N ha⁻¹ na parte aérea da cultura está localizado nas folhas secas e ponteiros. Essa quantidade de N permanecendo no solo como palhada no sistema sem queima, pelos vários ciclos da cultura, representa pouco mais da quantidade do adubo nitrogenado empregado nas adubações de cobertura em soqueira de cana-de-açúcar, que atualmente está em torno de 100 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N (TRIVELIN; VICTORIA; RODRIGUES, 1995).

Em grande parte dos experimentos com cana-planta verificou-se uma baixa resposta da cultura à adubação nitrogenada, enquanto que, para as rebrotas da cultura (cana-soca) a maioria dos experimentos mostram resposta positiva para produção de colmos (CARNAÚBA, 1990). Vários fatores têm sido listados para explicar as baixas respostas da cultura ao N aplicado no plantio, entre os quais a mineralização da matéria orgânica do solo e dos restos culturais da própria cana, favorecida pelo revolvimento do solo durante a reforma do canavial, o maior vigor do sistema radicular da cana-planta comparado ao da soqueira, a melhoria da fertilidade do solo associado à calagem, a fixação biológica do N, a menor demanda inicial por nutrientes na cana-planta, as perdas de N do adubo por lixiviação e a contribuição do N contido no colmo-semente (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007).

A dinâmica do N no solo apresenta elevada complexidade, fazendo com que as respostas da cana-de-açúcar a esse nutriente sejam muito variáveis. Adicionalmente, a inexistência de qualquer tipo de análise de solo que auxilie os técnicos na definição da dose de N a aplicar no plantio da cana-de-açúcar. Aliada ao grande número de cultivares existentes, tipos de solos, épocas de plantio, regimes hídricos, modalidades de aplicação do adubo e outras estratégias relacionadas ao setor sucroalcooleiro dificultam a decisão sobre a fertilização nitrogenada dos canaviais (OTTO, 2007).

2.1.2 Diversidade microbiana no solo

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada do planeta (WITHMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (Figura 1), sendo que os procariotos (domínios *Bacteria* e *Archaea*) representam a maior parte dessa biota. Em virtude da sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, os microrganismos acumularam uma impressionante diversidade genética, que excede, em muito, a diversidade dos organismos superiores (WARD, 1998; HUNTER-CEVERA, 1998). Sendo assim, os microrganismos representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica (HUNTER-CEVERA, 1998).

A microbiota do solo apresenta elevada diversidade genética e funcional, paralelamente caracterizada através de estudos com base no cultivo de microrganismos e estudos de seu DNA. Através da análise da cinética de reassociação de DNA, tem sido estimado que um grama de solo pode conter mais de 10.000 espécies de bactérias diferentes (TORSVIK et al., 1998). Recentemente, através do seqüenciamento em massa do gene rRNA 16S para avaliar a diversidade bacteriana nos solos, Roesch et al. (2007) estimaram que um grama de solo pode conter cerca de 52.000 espécies. A densidade dos diferentes grupos de microrganismos varia em função de características edáficas e climáticas específicas de cada ambiente. Uma das principais limitações para avaliação da diversidade microbiana nos solos é a natureza complexa, heterogênea e dinâmica desse ambiente.

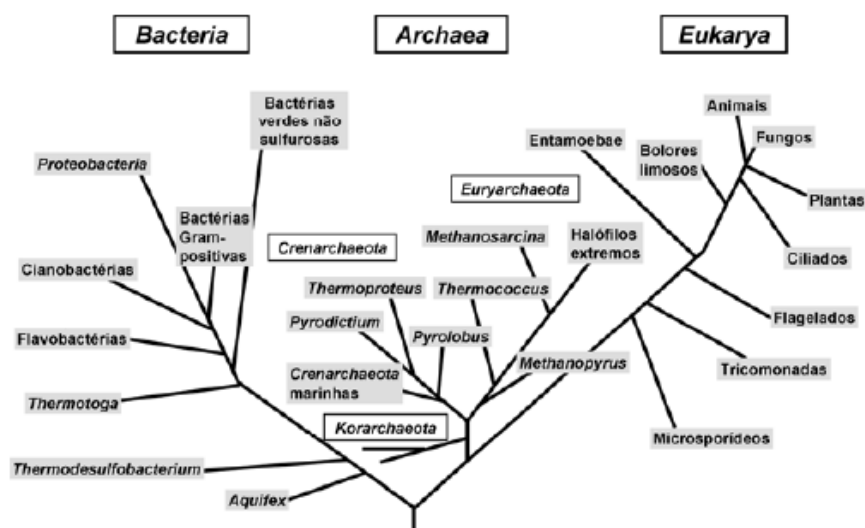


Figura 1 - Relações evolutivas entre organismos dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, determinadas pela análise comparativa das seqüências de nucleotídeos da RNA ribossômico. Fonte: Lambais et al. (2005)

As quantidades de nutrientes imobilizadas na biomassa microbiana podem atingir valores bastante elevados (acima de 100 kg ha^{-1} , no caso do N), e esses estão em equilíbrio dinâmico com os nutrientes da solução do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1980). Os nutrientes retidos na biomassa são liberados para a solução do solo na medida em que os microrganismos morrem e são mineralizados, de modo que a biomassa microbiana atua como um reservatório de nutrientes no solo, controlando sua disponibilidade por meio dos processos de mineralização e imobilização (VARGAS; SCHOLLES, 1998).

Os resíduos orgânicos de origem vegetal são a principal fonte de matéria orgânica para o solo, e a microbiota do solo é a principal responsável por sua decomposição, influenciando tanto na cinética da transformação da matéria orgânica e formação de húmus, quanto na estocagem de carbono (C) e nutrientes (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003). Apesar de representar uma pequena fração do total da matéria orgânica do solo (MOS), os microrganismos são essenciais para a manutenção das funções dos ecossistemas, incluindo agroecossistemas.

A calagem e a adubação mineral podem favorecer a atividade microbiana de forma direta (aumento do pH e a disponibilidade de nutrientes às células dos microrganismos) e de forma indireta (maior produção vegetal, que acarreta um aumento da atividade rizosférica e dos resíduos adicionados ao solo), porém a utilização de adubos nitrogenados

provoca a acidificação do solo e conseqüentemente afeta os organismos presentes nele (BÜNEMANN; SCHWENKE; VAN ZWIETEN, 2006), que sofrem influência também do manejo dos restos culturais e o grau de preparo do solo, pois estes afetam a temperatura, umidade, aeração e distribuição destes resíduos na camada arável do solo.

A relação entre diversidade microbiana e qualidade do solo tem sido muito discutida, mas não foi ainda completamente definida. O tempo necessário para o ecossistema retornar ao seu estado inicial, após um distúrbio qualquer, define a resiliência do sistema, ou seja, quanto maior esse tempo, menor a resiliência. Se a diversidade das comunidades microbianas do solo está diretamente relacionada com sua resiliência, ainda não está definido, no entanto, esta é uma hipótese plausível, se considerarmos que a diminuição da diversidade pode resultar em diminuição da redundância de funções bioquímicas e conseqüente redução da diversidade metabólica (REBER, 1992).

2.1.3 Métodos utilizados para determinação da diversidade microbiana do solo

Apesar de não ser recente, a discussão sobre o uso de indicadores de qualidade do solo vem ganhando força e expõe a dificuldade de se chegar a um consenso sobre quais parâmetros são capazes de atestar o impacto de práticas agrícolas nos solos. O conceito de qualidade do solo surgiu no final da década de 70, e durante os 10 anos seguintes esteve muito associado ao conceito de fertilidade (KARLEN; DITZLER; ANDREWS, 2003). Acreditava-se, por exemplo, que um solo quimicamente rico era um solo com alta qualidade, isto porque tinha a capacidade de prover a produção agrícola. Entretanto, a percepção de qualidade do solo evoluiu, e, num entendimento mais amplo, percebe-se que não basta apenas o solo apresentar alta fertilidade, mas, deve possuir também boa estruturação e abrigar uma alta diversidade de organismos (ZILLI et al., 2003).

Em termos práticos, os agricultores utilizam como indicadores determinadas plantas, insetos e minhocas, além da análise da fertilidade química do solo, presença de erosão na propriedade, teor de matéria orgânica e compactação do solo (KARLEN; DITZLER; ANDREWS, 2003). No meio científico, além desses parâmetros, figuram as avaliações de atividade microbiana, como a utilização de fontes de C e a abundância e diversidade dos macro e microrganismos (TURCO; BLUME, 1999).

Vários autores sugerem que a biomassa microbiana do solo (BMS) pode ser utilizada como um indicador para se detectar efeitos dos sistemas de manejo nas propriedades biológicas e bioquímicas do solo, por ser muito sensível às alterações causadas pelo aumento no teor da MO, tipo de cultivo e outras práticas como rotação de culturas e adubação (CARTER, 1986; POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987; ANGERS, 1993; MORAIS, 2004; MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003).

A biomassa microbiana é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, representando, na maioria dos casos, aproximadamente 2% do C orgânico nele presente (PAUL; CLARK, 1989). As quantidades de N imobilizadas na biomassa podem atingir mais de 100 kg ha⁻¹ (ANDERSON; DOMSCH, 1980). Além disso, a biomassa global de procariotos pode conter 85-130 x 10⁹ toneladas de N e 9-14 x 10⁹ toneladas de P, representando o maior reservatório desses nutrientes em organismos vivos (LAMBAIS et al., 2005). O N retido na biomassa microbiana é liberado na medida em que os microrganismos morrem e são mineralizados pelas populações restantes. Portanto, a biomassa microbiana atua como um tampão do N e outros nutrientes no solo, controlando sua disponibilidade por meio dos processos de mineralização e imobilização.

Os métodos de avaliação da BMS são bastante variados, mas, de forma geral, permitem estimar o reservatório de C e, também, de outros nutrientes contidos nos microrganismos (DE-POLLI; GUERRA, 1997). Por meio dessa abordagem, tem sido demonstrado que o acúmulo de nutrientes na biomassa microbiana varia em função do manejo agrícola adotado em cada agroecossistema (CATTELAN; VIDOR, 1990; MORAIS, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O uso desses parâmetros como indicadores de qualidade do solo pode ser comprometido, uma vez que a abundância e atividade dos microrganismos são muito suscetíveis às variações sazonais, principalmente temperatura e umidade. Além disso, a biomassa microbiana fornece apenas uma estimativa da quantidade de microrganismos presentes no solo, não considerando sua composição ou a estrutura das comunidades. Assim, compreende-se ser necessário agregar ao conhecimento da biomassa microbiana informações sobre seus aspectos qualitativos, de forma a permitir uma avaliação mais adequada da microbiota presente no solo. Daí a importância dos parâmetros que medem a

atividade microbiana para avaliar o estado metabólico atual e potencial das comunidades de microrganismos do solo (ZILLI et al., 2003).

O perfil metabólico microbiano, medido pela capacidade de utilização de fontes de C, também tem potencial de indicar possíveis mudanças no ambiente, ocasionadas por diferentes condições ambientais e manejos de culturas agrícolas. Um dos métodos utilizados para medir padrões de utilização de substratos de C utiliza microplacas Biolog. Essa metodologia foi desenvolvida inicialmente utilizando microplacas contendo 95 substratos de C e tetrazólio, as quais eram utilizadas para a caracterização taxonômica de bactérias patogênicas (GARLAND; MILLS, 1991). Posteriormente, foi desenvolvida a Ecoplate Biolog contendo 31 substratos diferentes de C normalmente encontradas no solo e um controle sem C, com 3 repetições (CHOI; DOBBS, 1999). A diversidade metabólica é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica, e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK et al., 1994).

Uma das limitações da utilização das placas Biolog para o estudo de comunidades microbianas é o favorecimento de bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias facultativas de rápido crescimento (CLASSEN et al., 2003). Além disso, essa metodologia reflete a diversidade metabólica potencial e não aquela existente *in situ* (GARLAND; MILLS, 1991). Deve-se considerar também que, o tempo de incubação pode ser fator limitante para populações pouco abundantes, indicando falsos negativos. Apesar das limitações, o método Biolog pode revelar diferenças consideráveis nos padrões de utilização de substratos de C pelas comunidades microbianas (ZAK et al., 1994; GRAHAM; HAYNES, 2005).

Por meio dessa técnica, Graham e Haynes (2005) verificaram redução da diversidade metabólica das comunidades microbianas do solo no cultivo de cana-de-açúcar com queima prévia a colheita, comparado com o cultivo sem queima. Também Lupwayi et al. (2001) compararam os perfis fisiológicos de comunidades microbianas (PFCMs) em solos sob manejo convencional e plantio direto e observaram que a diversidade metabólica aumentava em solos sob plantio direto, quando a cultura já estava estabelecida e com o aumento do tamanho dos agregados. Bending, Putland e Rayns (2000) consideram que o perfil de utilização de substratos de C pelos microrganismos do solo é um parâmetro mais sensível do que a medição da biomassa microbiana, quando o objetivo é avaliar a qualidade do solo com base em suas propriedades microbiológicas.

Porém, técnicas tradicionais baseadas em cultivo de microrganismos são insuficientes para responder questões sobre a composição, estrutura e estabilidade das comunidades microbianas (ROSADO et al., 1997). O estudo da microbiota utilizando meios de cultura apresenta grandes limitações, uma vez que, somente uma pequena porcentagem (1 a 5 %) dos microrganismos do solo pode ser cultivada em laboratório (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Além disso, os microrganismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados, havendo uma seleção em função da habilidade do microorganismo em se desenvolver em meio com altas concentrações de nutrientes e geralmente em condições aeróbias.

Com o advento da biologia molecular, tem sido possível avaliar mais facilmente e de forma mais sensível a estrutura das comunidades de microrganismos no solo (ZILLI et al., 2003). Técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos retiradas diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células, têm contribuído para o avanço nos estudos de ecologia microbiana (BENLLOCH; MARTINEZ-MURCIA; RODRIGUEZ-VALERA, 1995). A estrutura de comunidades microbianas vem atualmente sendo estudada através de métodos que se baseiam na investigação de parte da seqüência do gene rRNA 16S de bactérias, ou rRNA 18S de fungos, a qual amplificada por PCR (Polimerase Chain Reaction) e posteriormente caracterizada através de clonagem e seqüenciamento ou por eletroforese, por meio de técnicas como o DGGE (Denaturing Gradiente Gel Eletrophoresis) (KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2001). O gene rRNA 16S possui características fundamentais que possibilitam sua utilização em estudos de ecologia, tais como: presença de regiões com seqüência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas, presença em todos os procariotos, a aparente ausência de transferência genética lateral e tamanho considerado satisfatório (cerca de 1.500 nucleotídeos) para estudos filogenéticos (AMANN; LUDWIG, 2000).

O emprego dessas técnicas se tornou possível a partir dos estudos de Pace et al. (1986), pioneiros nas análises de estrutura de comunidades microbianas utilizando as informações da seqüência de nucleotídeos do gene rRNA 16S.

Muyzer, Wall e Uitterlinden (1993) foram os primeiros a utilizar PCR-DGGE com o objetivo de avaliar a diversidade de amplicons do gene rRNA 16S de uma comunidade microbiana. Muito embora existam várias limitações, a PCR-DGGE de fragmentos do gene rRNA 16S é uma metodologia adequada para análises comparativas de duas ou mais comunidades bacterianas (MUYZER; WALL; UITERLINDEN, 1993; JACKSON; RODEN; CHURCHILL, 2000). Diferenças significativas na composição das comunidades bacterianas foram observadas por Cookson et al. (2007), comparando solos sob diferentes usos (solo sob floresta, pastagem, manejo orgânico e convencional), avaliando os perfis de *amplicons* do gene rRNA 16S por DGGE. Por meio da utilização da técnica PCR-DGGE, Ruppel et al. (2007), puderam observar mudança na estrutura da comunidade bacteriana em solo com adubação nitrogenada, em relação ao solo onde não foi aplicado o fertilizante. No entanto, uma série de limitações são intrínsecas da metodologia. Muyzer e Smalla (1998) demonstraram que nem sempre é possível separar fragmentos de DNA que tenham pequenas variações nas seqüências. Um resultado similar foi descrito por Buchholz-Cleven, Rattunde e Straub (1997), onde não foi possível separar fragmentos de rRNA 16S com diferenças de dois a três nucleotídeos. Vallaeyts et al. (1997) mostraram que fragmentos do gene rRNA 16S, obtidos de diferentes bactérias oxidantes de metano, não puderam ser observados após DGGE. Se amostras apresentarem padrões de bandeamento de amplicons diferentes, então, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças. O contrário não é verdadeiro, e amostras com padrões de bandeamento de amplicons idênticos podem apresentar estruturas de comunidade diferentes. Nesse caso, uma abordagem polifásica deve ser adotada para determinar as alterações nas estruturas dessas comunidades microbianas (LAMBALIS et al., 2005).

Para avaliar melhor a diversidade de um agroecossistema, pode-se realizar também o seqüenciamento de bibliotecas de clones de rDNA 16S. Esse processo envolve a amplificação de um fragmento específico do gene rRNA 16S, a partir do DNA metagenômico, utilizando-se iniciadores específicos, clonagem desses amplicons em vetores apropriados e seqüenciamento dos insertos (ARMANN; LUDWIG, 2000).

Apesar das limitações da utilização de PCR para obtenção de clones representativos de uma comunidade devido à amplificação preferencial de algumas subpopulações mais abundantes, em detrimento das menos abundantes (LAMBALIS et al., 2005), esta técnica

possibilita a estimativa da diversidade microbiana em função de alterações no ambiente (poluição, manejo agrícola etc.), principalmente no solo (OVREAS et al., 1998; NUNES, 2006; BARETTA, 2007; LÓPEZ-GARCIA; MOREIRA, 2008). Utilizando essa técnica, Roesch et al. (2007) obtiveram mais de 53.000 seqüências do gene rRNA 16S de bactérias, estudando solos sob floresta e solos agrícolas. Nesse estudo os autores observaram que solos agrícolas são ricos em número de espécies, porém com menor número de filos que solos sob florestas, indicando que o manejo do solo tem influencia significativa na diversidade de bactérias.

As vastas quantidades de informações de seqüências de DNA e ferramentas de análise de dados disponíveis atualmente têm acelerado o desenvolvimento de novas metodologias para comparar a diversidade microbiana em diferentes ambientes, e para poder associá-la a atributos específicos do solo (LAMBBAIS et al., 2005).

2.1.4 Bactérias oxidadoras de amônio (AOB)

O N é elemento indispensável para os seres vivos, desempenhando importante papel na constituição das moléculas de proteínas e ácidos. Por ser um fator limitante ao crescimento dos vegetais, o N tornou-se um dos principais adubos utilizados na agricultura. A atmosfera aproximadamente 78% de N na forma molecular (N_2). Porém, a maioria dos organismos, animais e vegetais, não conseguem assimilar o N_2 presente na atmosfera devido a uma forte ligação triplíce entre os dois átomos de N. Apenas algumas espécies de bactérias (bactérias fixadoras de N ou diazotróficas) são capazes de reduzir o N_2 a NH_3 (REIS; TEIXEIRA, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As plantas absorvem o N mineral principalmente nas formas amoniacais (NH_4^+) e nítricas (NO_3^-). No solo, a forma predominante é a orgânica ($RCOOH NH_2$), o que implica necessariamente na ocorrência de transformações para que o N-orgânico seja mineralizado para NH_4^+ , principalmente por atividades microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NDAW, 2007).

Os processos de transformação do N no solo envolvem a amonificação, imobilização, nitrificação e desnitrificação (Figura 2). A amonificação do N no solo refere-se ao processo de conversão do N-orgânico a amônia (NH_3^+). As principais fontes de N-

orgânico no solo são as proteínas, peptídeos, quitina, quitobiase, peptidoglicanos, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e uréia. Essas formas representam de 24 a 37% do N-orgânico do solo e são substratos para uma grande variedade de enzimas que liberam principalmente aminoácidos diversos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Compostos complexos presentes nos resíduos orgânicos são, em geral, rapidamente decompostos em substâncias mais simples por organismos que vivem no solo. As bactérias saprófitas e várias espécies de fungos, principais responsáveis pela decomposição de materiais orgânicos mortos, utilizam as proteínas e aminoácidos como fonte de N para a síntese de suas próprias proteínas, e liberam o excesso de N sob a forma de amônio (NH_4^+) (KENNEDY, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Após a etapa de amonificação do N-orgânico, pode haver a imobilização do N pela biomassa microbiana ou a nitrificação do NH_4^+ . A nitrificação é realizada através de dois passos, envolvendo dois grupos de bactérias quimiolitotróficas conhecidas como bactérias nitrificantes. Primeiro, ocorre a nitritação, na qual os íons NH_4^+ são oxidados a nitrito (NO_2^-) por bactérias oxidadoras de amônio (AOB) pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrosospira*, principalmente. Em seguida, ocorre a nitratação, que consiste na oxidação do NO_2^- a nitrato (NO_3^-), a qual é realizada pelas bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), principalmente do gênero *Nitrobacter* (DE BOER; KOWALCHUK, 2001; GEETS et al., 2007). O NO_2^- raramente acumula-se em concentrações detectáveis no solo, pois normalmente o processo de nitratação ocorre em taxa mais elevada do que a nitritação. O NO_3^- , quando liberado para o solo, pode ser absorvido pelas plantas, após redução para NH_4^+ . Em condições anóxicas e na presença de NO_3^- pode ocorrer a desnitrificação, onde o NO_3^- é reduzido a N_2 ou N_2O .

Pelo fato da nitrificação ser o processo aeróbico central na ciclagem biogeoquímica do N, ela pode ser um bom indicador da atividade biológica e da fertilidade do solo. O conhecimento da diversidade dos organismos envolvidos nessa transformação poderia contribuir para o melhor controle desse processo, promovendo aumentos na produtividade vegetal com menores riscos de perdas de NO_3^- por lixiviação e, conseqüentemente, contaminação de lençóis freáticos. Os estudos da diversidade microbiana em solos freqüentemente enfocam as mudanças na estrutura da comunidade após situações de estresse ou alterações de manejo, porém poucos são os trabalhos abrangendo um grupo

funcional específico. Entretanto, a análise da heterogeneidade espacial dos microrganismos no solo pode ser mais bem compreendida por meio do monitoramento de um grupo específico de microrganismos (DEGRANGE; BARDIN, 1995; HARMS et al., 2003; BALL-COELHO et al., 2004; VENTEREA et al., 2004; CENCIANI, 2007).

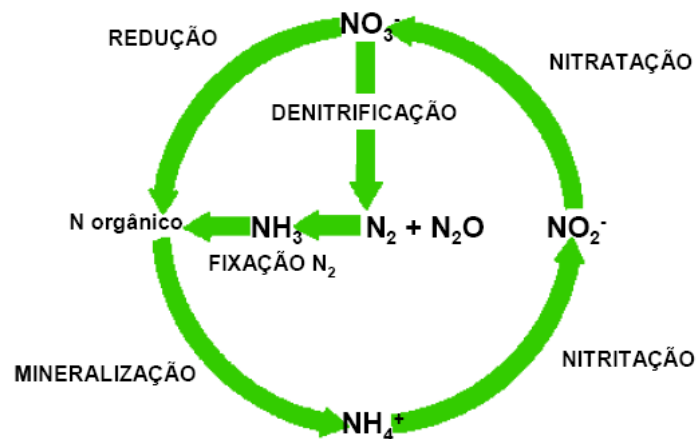


Figura 2 – Principais processos do ciclo do nitrogênio no solo. Fonte: Cenciani (2007)

No solo, as AOB desempenham papel essencial e mais limitante nas transformações do N (PROSSER; EMBLEY, 2002). Por essa razão, bem como por certas dificuldades metodológicas, essas bactérias têm sido mais intensamente estudadas do que as NOB nos últimos anos (KOWALCHUK et al., 1997). Apesar das AOB desempenharem papel essencial na etapa inicial do processo de nitrificação, o qual determina em parte o destino do N no solo, ainda não se sabe como os fatores abióticos afetam a diversidade dessas bactérias, especialmente em solos tropicais. Avanços recentes no campo da biologia molecular, usando iniciadores específicos para amplificação do gene rRNA 16S de AOB, têm permitido a detecção e a quantificação das populações naturais de nitrificadores no solo em estudos de diversidade funcional, o que não era possível com a utilização dos meios de cultivo tradicionais (OKANO et al., 2004; KUROLA et al., 2005).

O conhecimento da dinâmica populacional das AOB é capaz de ajudar no manejo do ciclo do N, diminuindo suas perdas nos agroecossistemas. Segundo Okano et al. (2004), os efeitos das práticas agrícolas como irrigação, manejo do solo e manejo da cobertura vegetal alteram a abundância da estrutura de comunidades de AOB no solo. Dessa forma, a ação antrópica sobre os ecossistemas promove alterações nas comunidades microbianas nitrificadoras, afetando diretamente os processos por elas mediados. Além dos fatores

antrópicos, fatores abióticos tais como, taxa de mineralização do N, umidade do solo, pH e teor de amônio, têm influência direta na diversidade das AOB no solo (AVRAHAMI et al., 2002). Avaliando a influência da diversidade de plantas e das mudanças no uso da terra sobre a diversidade de AOB, Carney, Matson e Bohannan (2004) mostraram que a diversidade de AOB não se altera nos tratamentos com as diferentes plantas (*Cordia alliodora*, *Heliconia imbricata*, *Euterpe oleracea*, *Euterpe macrospadix*, *Hyeronima alchorneoides* e *Cedrela odorata*), mas foi significativamente alterada na conversão de floresta em pastagem, e correlacionou-se positivamente com as taxas de nitrificação. Os autores detectaram a predominância de espécies do gênero *Nitrosospira* nos tratamentos, mas uma maior proporção de *Nitrosomonas* em solos com cobertura de pastagem. Cenciani (2007) observou também maior diversidade de bactérias nitrificadoras, avaliada pelo seqüenciamento do gene rRNA 16S, em solo sob pastagem e capoeira do que no solo sob floresta. As seqüências de AOB encontradas apresentaram maior similaridade com as espécies *Nitrosospira* sp., *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira tenuis*, *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosovibrio tenuis* e *Nitrosolobus multiformis*. Estes resultados sugerem que o gênero *Nitrosospira* ser dominante em sistemas mais ricos em nutrientes.

Kurola et al. (2005) estudaram a aplicação de métodos moleculares para investigar o tamanho, atividade e diversidade das populações de AOB em solo contaminado por hidrocarbonetos. Da mesma forma, foi observado uma dominância de seqüências pertencentes ao gênero *Nitrosospira* nos solos com altos níveis de hidrocarbonetos, sugerindo que esse gênero de AOB é também dominante em solos ricos em hidrocarbonetos.

Espécies raras de AOB podem ser importantes indicadores ambientais. Kowalchuk et al. (1997) compararam dois solos de dunas localizadas em praias Holandesas com diferenças no pH e na distância em relação ao mar. Utilizando o seqüenciamento do gene rRNA 16S específico de AOB, desses ambientes, os autores demonstraram que as estruturas das comunidades de AOB dos diferentes locais eram diferentes. Amostras coletadas mais próximas ao mar continham seqüências relacionadas a seqüências previamente isoladas em ambientes marinhos, foi o único onde gênero *Nitrosomonas* foi detectado. Foi observada também, diferença nas populações de *Nitrosospira* entre as amostras de solos mais ácidos e mais alcalinos. Diferenças na estrutura das comunidades de

bactérias nitrificadoras, podem refletir também diferenças fisiológicas, com conseqüente efeito nas taxas de nitrificação, em resposta a fatores ambientais.

Dados sobre a estrutura das comunidades e AOB em solos agrícolas brasileiros são escassos, e um estudo mais detalhado dessas comunidades pode ser importante para explicar as diferenças nas taxas de nitrificação em diferentes agroecossistemas.

2.2 OBJETIVOS

- Monitorar as alterações promovidas na biodiversidade, biomassa e atividade microbiana por diferentes sistemas de manejo de colheita de cana-de-açúcar (com e sem queima prévia a colheita).
- Avaliar as alterações na atividade e na estrutura das comunidades de bactérias do solo em função de doses de N aplicadas no plantio da cana-de-açúcar (cana-planta) sem queima.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Áreas experimentais e instalação dos experimentos

Foram conduzidos dois experimentos em diferentes locais do estado de São Paulo. O primeiro experimento, no município de Novo Horizonte, com o objetivo de comparar o efeito da queima da cana-de-açúcar para a colheita na comunidade de bactérias do solo. O segundo experimento, nos municípios de Pirassununga e Jaboticabal, com o objetivo de verificar se a comunidade bacteriana do solo é afetada pela adição de adubo nitrogenado.

2.3.1.1 Experimento 1

O experimento foi desenvolvido na Usina São José da Estiva (21°30'45"S e 49°13'08"W), localizada no município de Novo Horizonte sobre um LATOSSOLO VERMELHO AMARELO. Foram utilizadas três cultivares de cana-de-açúcar (SP81-3250, SP80-1842 e RB72-454). Os sistemas de manejo avaliados constituíram de colheita sem queima (mecanizada) e com queima (manual) prévia a colheita. O plantio das cultivares foi

feito no dia 16 de abril de 2004, e a primeira colheita da cana-de-açúcar foi realizada em 22 de setembro de 2005.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições.

Anteriormente à implantação do experimento na área, houve o cultivo de cana-de-açúcar variedade SP71-1406 com 10 cortes, com queima previamente a cada colheita, seguido de um cultivo de soja.

2.3.1.2 Experimento 2

Para esse segundo experimento utilizou-se duas áreas localizadas nos municípios de Pirassununga e Jaboticabal. Em ambas as áreas o sistema foi de cana sem queima (mecanizada) prévia a colheita, em cultivo mínimo, mantendo-se sobre a superfície do solo a palhada da última colheita, no ciclo de cana-planta. A cultivar utilizada foi a SP81-3250. O fator de estudo nesse experimento foi a dose de N (40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹) na forma de uréia (U). A aplicação da uréia foi feita no sulco de plantio. Um tratamento sem a aplicação de N foi utilizado como controle.

Os sulcos foram abertos com cerca de 0,35 m de profundidade, sendo plantadas cerca de 15 gemas viáveis por metro. A adição no sulco foi feita com o equivalente a 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 120 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente. Antes das mudas serem cobertas com solo foi aplicado inseticida e nematicida. As mudas foram cobertas com uma camada de 0,1 m de terra.

Os tratamentos foram distribuídos em 4 blocos casualizados. Cada parcela experimental foi constituída de 48 sulcos espaçados em 1,5 m, com 15 m de comprimento, totalizando 1.080 m² por parcela. O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados, com 4 tratamentos e 4 repetições.

Nas duas áreas experimentais o preparo do solo foi convencional. Os manejos adotados nas áreas estão detalhados a seguir.

2.3.1.2.1 Usina São Luiz (USL – Pirassununga)

O experimento foi instalado na Usina São Luiz (21°55'54"S e 47°10'54"W), no município de Pirassununga, Estado de São Paulo, sobre um LATOSSOLO VERMELHO AMARELO eutrófico, com plantio de 21 a 23 de fevereiro de 2005. O primeiro corte da cana-de-açúcar ocorreu em 23 e 24 de junho de 2006.

A seqüência de operações para instalação do experimento foi passagem de grade aradora para eliminação da soqueira, subsolagem, aplicação de 2 t ha⁻¹ de calcário dolomítico e 2 t ha⁻¹ de gesso agrícola, passagem de grade aradora, passagem de grade intermediária e sulcação.

2.3.1.2.2 Usina Santa Adélia (USA – Jaboticabal)

O experimento foi instalado na Usina Santa Adélia (21°19'98"S e 48°19'03"W), no município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, em um LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico, com plantio de 4 a 8 de abril de 2005. O primeiro corte da cana-de-açúcar ocorreu em 26 de julho de 2006.

A seqüência de operações, para a instalação do experimento, foi a aplicação de herbicida para dessecação da soqueira, aplicação de 2 t ha⁻¹ de calcário dolomítico, aração, gradagem intermediária e sulcação.

2.3.2 Amostragem

Nos dois experimentos, utilizando-se uma sonda (SondaTerra), foram coletadas amostras de terra nas profundidades 0-10 e 10-20 cm, na linha (Figura 3) e entrelinha (Figura 4) de plantio. Foram obtidas quatro amostras composta de 12 amostras simples, por parcela, para cada profundidade e posição (linha e entrelinha).

As amostragens do experimento 1 foram realizadas nos dias 15 de dezembro de 2005 no experimento 1. As amostragens do segundo experimento foram realizadas nos dias 13 de setembro de 2005 e 13 de junho de 2006, na Usina São Luiz (Pirassununga), e 1 de novembro de 2005 e 10 de agosto de 2006, na Usina Santa Adélia (Jaboticabal).



Figura 3 - Amostragem de solo na linha de plantio, utilizando-se sonda



Figura 4 - Amostragem de solo na entrelinha de plantio, utilizando-se sonda

Uma alíquota de aproximadamente 10 g de terra de cada amostra foi armazenada a - 80°C, para posterior extração de DNA total do solo.

2.3.3 Determinações

2.3.3.1 Atributos químicos do solo

Amostras de terra da camada 0-20 cm, dos dois experimentos, secas ao ar foram utilizadas para determinação de: pH, H+Al, Al, Ca, Mg, K, Na, P, S total, N total, C-org, M.O., B, Cu, Fe, Mn, Zn e capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (CTC). Os métodos

adotados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Metodologia para a análise química do solo dos parâmetros estudados

Variável do solo	Método ou extrator	Referência
pH	Medido em CaCl ₂ 0,01M	Raij et al., 2001
H+Al	pH em SMP	Raij et al., 2001
Al trocável	KCl 1M e titulação com NaOH 0,025M	Raij et al., 2001
Ca, Mg trocáveis e P	Resina trocadora de íons	Raij et al., 2001
K e Na trocáveis	Melich 1	Embrapa, 1999
S total e N total	Combustão em analisador elementar NCS	Thermo Fisher Scientific
Cu, Fe, Mn e Zn trocáveis	DTPA	Raij et al., 2001
B	BaCl ₂ em microondas	Embrapa, 1999
C-org	Digestão com K ₂ Cr ₂ O ₇	Raij et al., 2001
M.O.	Walkley-Black	Embrapa, 1999
CTC (pH 7,0)	Somatória dos teores de H+Al, Ca, Mg, K, Na	
saturação da CTC%	Saturação = (Ca, Mg, K, Na, Al)*100/CTC	

2.3.3.2 Biomassa microbiana

2.3.3.2.1 Carbono da biomassa microbiana (CBM)

O teor de CBM foi determinado nos dois experimentos, na linha e entrelinha de plantio, nas duas profundidades, em todos os tratamentos.

Das subamostras 0-10 e 10-20 cm, retiraram-se duas alíquotas de 10g de solo para determinação da quantidade de carbono da biomassa microbiana (CBM) pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). A primeira alíquota foi fumigada em dessecador contendo um béquer com pérolas de vidro e clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob vácuo. Depois de 24 horas foi retirado o resíduo de clorofórmio do dessecador. A segunda alíquota serviu de controle (não-fumigada). Às amostras foi adicionado 40 mL de K₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e as mesmas foram agitadas por 30 minutos. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. O C-org dos extratos foi determinado por digestão de 10 mL do filtrado com 1 mL de K₂Cr₂O₇ e 10 mL de uma mistura de H₂SO₄ e H₃PO₄ concentrados (1:1, v:v), em erlenmeyers de 50 mL. Esta solução permaneceu em banho-maria a 90° C por 1 hora. Após serem resfriadas, as amostras receberam 10 mL de H₂O deionizada. O excesso de K₂Cr₂O₇ foi determinado por

titulação com sulfato ferroso de amônio, utilizando-se fenilamina sulfonato de bário como indicador.

2.3.3.2 Nitrogênio da biomassa microbiana (NBM)

O teor de NBM foi medido apenas no experimento 2, nas duas profundidades, na linha e entrelinha, em todos os tratamentos.

Para análise do nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi utilizado o método da fumigação-extração. Uma alíquota de 0,6 mL dos extratos de solo obtidos (fumigados e não-fumigados) foi adicionada a tubos de ensaio de 20 mL. Foi adicionado tampão de ácido cítrico e reagente ninidrina. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 20 minutos. Em seguida foi adicionada 4 mL de água com etanol (1:1). As soluções foram completamente misturadas e a absorbância medida em 570 nm. Como branco utilizou-se água, para cada batelada de determinação. Os teores de NBM são obtidos pela diferença entre a quantidade de compostos ninidrina (amônio, aminoácidos, proteínas e peptídeos) extraídos por 0,5 M de K₂SO₄ das amostras fumigadas e não-fumigadas (BROOKES; JOERGENSEN, 1990).

2.3.3.3 Diversidade metabólica (Biolog)

Para avaliação da diversidade metabólica da microbiota do solo, foram utilizadas as amostras do experimento 1, de todos os tratamentos, na linha e entrelinha de plantio, e duas profundidades.

À uma alíquota de 10 g de solo das subamostras 0-10 e 10-20 cm, foi adicionado a erlenmeyer contendo 190 mL de uma solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Essas suspensões foram agitadas por 25 minutos em agitador orbital (Tecnal TE-420), a 200 rpm e temperatura ambiente. Após 4 minutos de decantação, o sobrenadante foi transferido para tubo esterilizado e centrifugado a 6300g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pelete resuspendido em 20 mL de solução salina. Após 2 horas de decantação, à temperatura ambiente, alíquotas de 120 µL do sobrenadante, contendo 10³ a 10⁴ células bacterianas por mL, determinado pelo método do número mais provável (NMP)

(ANDRADE; HAMAKAWA, 1994), foram adicionadas às cavidades das microplacas Biolog ECO (Biolog Inc., Hayward, Califórnia). Para cada amostra foi utilizada uma microplaca. Cada microplaca Biolog contém 31 fontes de C (Tabela 2), em triplicata, e 1 cavidade sem nenhuma fonte de C (controle negativo com água), além do corante indicador tetrazólio violeta. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. O crescimento microbiano, avaliado pelo aumento da absorbância, foi determinado por espectrofotometria a 590 nm, utilizando-se um leitor de microplacas (Microplate Reader Benchmark, Biorad).

A utilização de uma fonte de C foi considerada positiva quando o índice de desenvolvimento da cor (W_E) foi maior do que 100, de acordo com Ibekwe e Kennedy (1998), sendo que:

$$W_E = [(W_A - W_O) / W_O] \times 100$$

Onde,

W_E = índice de desenvolvimento da cor;

W_A = absorbância de cada cavidade;

W_O = absorbância da cavidade controle.

A média dos índices de desenvolvimento de cor (MDCC), por placa, foi calculada de acordo com Garland & Mills (1991):

$$MDCC = \sum (W_A - W_O) / n$$

Onde,

MDCC = índice de desenvolvimento de cor médio;

W_A = absorbância de cada cavidade;

W_O = absorbância da cavidade controle;

n = número de substratos.

O Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM), para cada fonte de C, foi calculado de acordo com Garland (1996). O índice de diversidade de Shannon (H), que compreende tanto a riqueza de substratos como a intensidade com que os substratos são usados pela microbiota, foi calculado de acordo com Zak et al. (1994) utilizando-se a equação:

$$H = \sum p_i (\ln p_i)$$

Onde,

H = índice de diversidade de Shannon;

p_i = razão entre a atividade de utilização de determinado substrato e a atividade de utilização de todos os substratos.

A riqueza de substratos (S_S) foi determinada através do número total de substratos utilizados ($W_E > 100$) pela comunidade microbiana do solo. A equitabilidade de substratos (E), que mede a uniformidade de utilização de um substrato em relação ao número de substratos utilizados pela microbiota, foi calculada de acordo com a equação:

$$E = H / \ln S_S$$

Onde,

E = equitabilidade;

S_S = é a riqueza de substratos;

H = índice de diversidade de Shannon.

Tabela 2 - Fontes de C contidas nas microplacas Biolog. Categorização dos substratos de C de acordo com Insam (1997)

Polímero		
Glicogênio	Tween 40	Tween 80
α -Ciclodextrina		
Carboidrato		
D-Celbiose	i-Eritritol	α -D-Lactose
β -Metil-D-Glicosídeo	D-Xilose	D-Manitol
N-Acetil-D-Glicosamina	Ácido D-Galacturônico	γ -Lactona
Ácido Carboxílico		
Ácido γ -Hidroxibutírico	Ácido Itacônico	Ácido α -Cetobutírico
Ácido D-Glicosamínico	Ácido D-Galacturônico	Ácido D-Málico
Éster Metílico do Ácido Pirúvico		
Aminoácido		
L-Serina	L-Arginina	L-Asparagina
L-Fenilalanina	L-Treonina	Ácido Glicil-L-Glutâmico
Fenólico		
Ácido 2-Hidroxibenzóico	Ácido 4-Hidroxibenzóico	
Amina / Amida		
Feniletlanina	Putrescina	
Miscelânea		
D,L- α -Glicerol fosfato	Glicose-1-fosfato	

2.3.3.4 Análises da estrutura das comunidades de *Bacteria* por PCR-DGGE

2.3.3.4.1 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído de amostras da camada 0-10 cm, nos dois experimentos. Para extração do DNA foi utilizado o Kit FastDNA Spin For Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Em microtubos contendo granada finamente moída, foi adicionado 0,5 g de terra, 978 μL de tampão fosfato e 122 μL de tampão MT. Os tubos foram agitados por 30 s a 4 m s^{-1} em um homogeneizador FP120 FastPrep Cell Disruptor (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Em seguida os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a 13000 g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL. A essa suspensão adicionou 250 μL de tampão PPS e agitaram-se os microtubos 10 vezes por inversão. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 g e o sobrenadante coletado e transferido para um tubo de 15 mL (Falcon). Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de matriz de ligação, agitaram-se os tubos durante 2 minutos por inversão. Em seguida, os tubos foram colocados em suporte por 3 minutos para decantar a matriz de ligação. A matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter) e centrifugada por 2 minutos a 13000 g. A matriz foi lavada com 500 μL de solução SEWS-M, e o filtro centrifugado duas vezes por 2 minutos a 13000 g. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 50 μL de água ultrapura ao filtro e centrifugou-se por mais 2 minutos a 13000 g. A suspensão de DNA foi transferida para um microtubo limpo e o DNA foi quantificado por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% e comparação com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen, São Paulo, Brasil).

2.3.3.4.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S

Foram selecionadas as amostras da linha de plantio, nos dois experimentos, na camada 0-10 cm, para a amplificação por PCR. Para o experimento 1 foram utilizadas as amostras de terra sob a cultivar SP80-1842. No experimento foram avaliados todos os tratamentos.

A amplificação da região V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria*, foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 0,2 mM dNTP, 3 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen), 20 ng de DNA total, 25 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores PRBA338fgc (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3') e PRUN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997), e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 95° C, 30 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 92°, anelamento por 1 minuto a 55° C, extensão por 1 minuto a 72° C e extensão final por 10 minutos a 72° C.

Os produtos da reação de amplificação (*amplicons*) foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5X – gel e tampão de corrida). O DNA foi visualizado por coloração com SYBR- Green1 (Molecular Probes) utilizando luz ultravioleta. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

2.3.3.4.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante, para os dois experimentos, foi feita para as amostras selecionadas para a reação de amplificação por PCR do item 2.3.3.4.2.

Os *amplicons* do rDNA 16S foram separados por DGGE. Os géis de acrilamida (37,5: 1; m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante 15% a 55%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 60 °C e 200 V constantes por 3 horas, em um sistema DCode (BioRad), utilizando-se solução tampão 0,5X TAE. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de ácido acético 10% por 10 min, metanol 50% por 10 min e SYBR-Green I (Molecular Probes) 1:10000 (v:v) por 30 min, utilizando-se um agitador horizontal. Entre cada solução o gel foi lavado 3 vezes com água por 5 min. A imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se um densitômetro à laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences).

2.3.3.4.4 Análise de comunidades de Bactérias oxidadoras de amônio (AOB) através do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S

Essa análise foi realizada apenas no experimento 2, em função da adubação com N.

2.3.3.4.5.1 Seleção das amostras

Para a construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de AOB, foram selecionadas amostras do experimento 2, na camada 0-10 cm, na linha de plantio, nos tratamentos sem aplicação de N e 80 Kg ha⁻¹ de N. Essas amostras foram selecionadas pelo fato do adubo nitrogenado (Uréia) ter sido aplicado na linha de plantio, e o tratamento com aplicação de 80 de N Kg ha⁻¹, pois essa é a dose normalmente usada em plantações comerciais de cana-de-açúcar. Como controle foi avaliado também o tratamento sem aplicação de N. Foram construídas oito bibliotecas de clones do gene rRNA 16S. O DNA total das amostras de terra selecionadas foi extraído utilizando-se o kit FastDNA Spin for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), conforme descrito no item 2.3.3.4.1.

2.3.3.4.5.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S

Para a amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S do grupo de AOB, foram utilizadas amostras compostas das quatro parcelas nos tratamentos sem aplicação de N e 80 Kg de N ha⁻¹. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação foram: CTO 189f (5' GGA GRA AAG CAG GGG ATC G 3') e CTO 654r (5' CTA GCY TTG TAG TTT CAA ACG C 3') (KOWALCHUK et al., 1997). A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, pareamento por 30 segundos a 55°C, extensão por 45 segundos a 72°C (com o tempo aumentando um segundo/ciclo); e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. A solução para reação de PCR e a quantificação dos produtos da reação de amplificação foram as mesmas utilizadas para a amplificação do gene rRNA 16S de *Bacteria*.

2.3.3.4.5.3 Purificação dos *amplicons*

Os *amplicons* resultantes da amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 X) e visualizados por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes). Os *amplicons* foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

As bandas de DNA foram excisadas do gel de agarose e colocadas em microtubo de 1,5 mL, adicionando-se 1 μ L de uma solução tampão de captura (GE Helthcare) por mg de gel. O microtubo foi agitado vigorosamente em vortex e incubado a 60°C até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Após a dissolução total da agarose, a amostra foi centrifugada por 30 segundos a 12.000 g e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Cerca de 300 μ L da amostra foi transferido para a coluna de purificação, incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugada por 30 segundos a 12.000 g. Este processo foi então repetido com o volume restante da amostra. O líquido que passou pela coluna durante a centrifugação foi descartado e adicionou-se à coluna 500 μ L de tampão de lavagem (GE Healthcare), seguido de uma incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugação por 30 segundos a 12.000 g. A coluna foi então transferida para um microtubo de 1,5 mL. Para eluição do DNA adicionou-se 50 μ L de TE pH 8,0 diretamente na matriz da coluna, incubando-se por 10 minutos, e em seguida centrifugou-se por 30 segundos a 8.000 g. O DNA recuperado no microtubo foi novamente centrifugado por 90 segundos a 8.000 g, para remover a resina remanescente. A solução de DNA foi então transferida para novo microtubo de 1,5 mL. A qualidade do DNA foi determinada após eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 X) e coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes). O marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão de tamanho e quantidade de DNA.

2.3.3.4.5.4 Clonagem dos *amplicons* do gene rRNA 16S

Os *amplicons* do gene rRNA 16S purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos

amplicons ao plasmídeo pGEM-T Easy foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM de Tris-HCl pH 7,8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP e 5% de polietileno glicol) e 3 U de T4 DNA ligase. A solução foi incubada a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformada por choque térmico utilizando-se o produto da reação de ligação descrita. As células transformadas foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) – ágar contendo ampicilina (40 µg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactose; 20 µg mL⁻¹), e colônias contendo o plasmídeo recombinante selecionadas. As bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram cultivadas em 1 mL de meio CircleGrow (CG) líquido contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) a 38 °C, sob agitação horizontal a 300 rpm (agitador horizontal INOVA 4300), durante 22 horas.

2.3.3.4.5 Extração do DNA plasmidial

Após o cultivo das bactérias contendo o plasmídeo recombinante em microplacas, as suspensões celulares foram centrifugadas por 6 minutos a 4.000 g, a 20 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pélete obtido foi lavado com 240 µL de uma solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose, centrifugado a 20°C por 6 minutos a 4.000 g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 80 µL da solução tampão, e em seguida, as células foram ressuspensas por agitação. Para uma microplaca de fundo “U” contendo 1 µL de RNase em cada cavidade (10 mg mL⁻¹) foram transferidos 60 µL de cada suspensão de células. Em cada poço da placa foram adicionados 60 µL da solução de lise (NaOH 0,2 N e SDS 1%), a placa foi selada, a suspensão homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 µL de solução contendo 3M de acetato de potássio, 10% de ácido acético glacial, misturando por inversão. A placa foi mantida por 10 minutos a temperatura ambiente, e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos (4.000 g, 20°C). o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22) fixada sobre uma placa de fundo “V” de 250 µL, e o conjunto centrifugado (sem a tampa) por 4 minutos a 4.000 g a 4 °C. Ao filtrado adicionou-se 110 µL de

isopropanol gelado e em seguida centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 g a 4 °C. O precipitado de DNA foi então lavado com 180 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4.000 g por 5 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se por 1 minuto a 900 g a 4 °C. Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi resolubilizado em 80 µL de água ultrapura estéril, durante toda a noite, e armazenado a -20 °C. O DNA foi quantificado através de espectrofotometria a 260 nm, e sua integridade determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5 X).

2.3.3.4.5.6 Seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S

Para o seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S utilizou-se 200-500 ng de DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'), 2 µL de *DYEnamic ET Terminator* (GE Healthcare), 2 µL de solução tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf), com as seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C. Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% gelado. As suspensões foram centrifugadas a 4.000 g por 45 minutos, e o pélete lavado com etanol 70%, a temperatura ambiente. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas, ressuspendido em formamida e desnaturado a 96°C por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.3.4 Análises estatísticas

A análise univariada dos dados foi realizada pelo método dos quadrados mínimos (PROC GLM-SAS, 2002), considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 manejos x 3 variedades) no experimento 1 e blocos casualizados no experimento 2. Foi utilizado o teste ANOVA ($p < 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer para

comparações múltiplas de médias ($p < 0,05$). Os dados de CBM e NBM foram transformados para $\log x$ e os de MDCC e H foram transformados para $x^{0,5}$, para normalização. Visando discriminar as amostras de manejos sem e com queima da cana-de-açúcar, os dados químicos e de consumo de fontes de C no Biolog foram analisados através da análise discriminante do programa Systat 11.

Para determinar a influência das variáveis ambientais na variância da utilização das fontes de C pela microbiota do solo sob cana-de-açúcar (A_{590}) foi feita uma análise de redundância canônica (RDA), utilizando-se o programa “Canoco for windows 4.5”, com transformação dos dados para $\log x$. A RDA é baseada na análise de componentes principais (PCA), porém, ao contrário desta, a ordenação das amostras é condicionada diretamente pelas variáveis ambientais. Assim, permite medida direta da relação entre as variáveis ambientais e os dados multivariados. Para eliminar a colinearidade de dados e selecionar as variáveis que melhor explicam de forma significativa a variabilidade dos mesmos, utilizou-se “*Forward selection*” na RDA.

A similaridade entre as estruturas das comunidades bacterianas foi determinada com base na presença ou ausência de *amplicons* detectados após DGGE. O agrupamento hierárquico foi realizado por meio do programa Systat 11, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida. Com os dados de ausência e presença de *amplicons* após DGGE, também se fez uma análise de coordenadas principais (PCoA), utilizando o índice de similaridade de Jaccard para se calcular as coordenadas em um espaço de ordenação. As coordenadas calculadas pela PCoA foram utilizadas na RDA com o objetivo de relacionar esses dados com as variáveis ambientais.

As seqüências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20) e seqüências do vetor.

Para a afiliação filogenética das seqüências do gene rRNA 16S utilizou-se o programa RDPquery (COLE et al., 2007) o qual compara as seqüências com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (COLE et al., 2007) e baseado na distância

evolutiva entre as seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define possível classificação em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 2007), a partir do alinhamento feito no ClustalX 1.83 (GARRITY et al., 2001), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram computados e utilizados com o programa SPADE para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson, bem como para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN, 2007), além da estimativa da cobertura de amostragem.

A comparação entre as bibliotecas de seqüências do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Experimento 1

O uso ou não da prática da queima previamente à colheita da cana-de-açúcar pode mudar o equilíbrio do agrossistema por ser capaz de, entre outras coisas, alterar o metabolismo e a estrutura da comunidade microbiana e, assim, afetar alguns processos do ambiente. Utilizando-se Biolog e PCR-DGGE, foram avaliados o perfil metabólico microbiano e a estrutura das comunidades bacterianas, em solo com e sem queima antes da colheita da cana-de-açúcar com variáveis do solo e a produtividade de cana-de-açúcar.

2.4.1.1 Produção de colmos por hectare

Apesar do maior aporte de material orgânico sobre o solo na forma de palhada, o qual pode variar de 7 a 15 Mg.ha⁻¹.ano⁻¹ na colheita sem queima prévia (CAMPOS, 2003), a produtividade de cana-de-açúcar não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre os dois manejos de colheita, entre as variedades ou interações dos fatores manejo e variedade, após a primeira colheita da lavoura (Tabela 3).

Tal resultado pode ser devido ao pouco tempo após a colheita, sendo que a palhada ainda estava sobre o solo na época de amostragem. Por isso, parte do C não havia sido incorporada à matéria orgânica do solo após 84 dias da colheita, uma vez que não foi observada diferença no teor de C do solo entre o cultivo com e sem queima prévia da cana-de-açúcar (Tabela 3). Além do teor de C, a maioria das variáveis químicas também não respondeu aos tratamentos de manejo de colheita. Mudanças na produtividade também não foram encontradas no primeiro corte da cana-de-açúcar em um ensaio de longa duração, em que Resende et al. (2006) mostraram que aumentos na produtividade de cana-de-açúcar com queima em relação à sem queima apareceram somente na terceira colheita de um ciclo de produção de sete cortes e a partir da segunda colheita no segundo ciclo de seis cortes. Segundo os autores, as diferenças de produtividade dos dois manejos foram maiores no segundo ciclo, indicando que essas diferenças devem-se ao efeito cumulativo do aporte de material orgânico no solo ao longo dos anos, a partir do primeiro ciclo.

Tabela 3 - Produção de colmos, em ton.ha⁻¹, das três variedades de cana-de-açúcar sob os dois manejos de colheita

Variedade	Manejo		Média
	Sem queima	Com queima	
SP813250	135,0	134,1	134,6
SP801842	122,6	143,5	133,0
RB72454	124,7	138,4	131,5
Média	127,4	138,6	133,0

2.4.1.2 Atributos químicos do solo

Dos atributos químicos avaliados do solo, os teores de Al, B, Cu, Zn e a saturação da CTC por Al (m) e saturação por Mg (%Mg), foram os que apresentaram diferenças significativas entre os manejos de colheita avaliados (Tabela 4 e 5). Desses, todos tiveram valores superiores no solo sob a cana-de-açúcar com colheita sem queima, com exceção do teor de B, o qual foi maior no solo sob manejo de colheita com queima. Os teores de C orgânico no solo não diferiram entre os dois manejos de colheita.

Tabela 4 - Variáveis químicas do solo para a profundidade de 0-20 cm sob dois manejos de colheita de cana-de-açúcar

Variável	Manejo de Colheita ^(a)	
	Mecanizada	Manual
pH	5,76	5,61
H+Al (mmol _c .kg ⁻¹)	15,89	16,15
Al* (mmol _c .kg ⁻¹)	0,99 a	0,74 b
Ca (mmol _c .kg ⁻¹)	14,04	13,72
Mg (mmol _c .kg ⁻¹)	6,44	5,67
K (mmol _c .kg ⁻¹)	2,62	2,78
Na (mmol _c .kg ⁻¹)	0,20	0,15
P* (mg.kg ⁻¹)	10,28 a	8,17 b
B* (mg.kg ⁻¹)	0,291 b	0,361 a
Cu* (mg.kg ⁻¹)	0,229 a	0,118 b
Fe (mg.kg ⁻¹)	17,26	12,41
Mn (mg.kg ⁻¹)	6,51	6,68
Zn* (mg.kg ⁻¹)	0,167 a	0,100 b
C-org ¹ (g.kg ⁻¹)	6,24	6,24
S total (g.kg ⁻¹)	0,057	0,038
N total (g.kg ⁻¹)	0,464	0,472
CTC ² (mmol _c .kg ⁻¹)	39,20	38,47
V ³ (%)	58,71	57,40
Ca saturation ⁴ (%)	35,62	35,46
Mg saturation* ⁴ (%)	16,40 a	14,67 b
K saturation ⁴ (%)	6,69	7,27
Na saturation ⁴ (%)	0,52	0,39
Al* ⁴ (%)	2,53 a	1,93 b

(a) – Os valores apresentados para os dois manejos são médias de três repetições.

Tabela 5 - Teste de F na análise da variância para Manejo, Variedade, Interação Manejo x Variedade e Profundidade, segundo as variáveis químicas do solo, do perfil metabólico em cana-de-açúcar

Variáveis	Causas de variação			
	Manejo	Variedade	Manejo x Variedade	Profundidade (0-10cm e 10-20cm)
PH	ns	ns	ns	—
H+Al (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Al (mmol _c .kg ⁻¹)	*	ns	ns	—
Ca (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Mg (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
K (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Na (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	*	ns	—
P (mg.kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
B (mg.kg ⁻¹)	**	ns	ns	—
Cu (mg.kg ⁻¹)	**	ns	ns	—
Fe (mg.kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Mn (mg.kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Zn (mg.kg ⁻¹)	*	ns	ns	—
C orgânico (g.kg ⁻¹)	ns	ns	*	—
CTC (mmol _c .kg ⁻¹)	ns	ns	ns	—
Saturação por bases (V%)	ns	ns	ns	—
Saturação por Ca (%)	ns	ns	ns	—
Saturação por Mg (%)	*	ns	ns	—
Saturação por K (%)	ns	ns	ns	—
Saturação por Na (%)	ns	ns	ns	—
Saturação por Al (%)	*	ns	ns	—

ns – não significativo. * Significativo - $p < 0.05$ e ** Significativo- $p < 0.01$

2.4.1.3 Biomassa microbiana

Os níveis de CBM do solo não diferiram estatisticamente entre os tratamentos sob manejo de colheita, sem queima e com queima, e entre as variedades ($p > 0,05$) (Figuras 5 e 6). A interação manejo x variedade também não alterou significativamente a concentração de CBM do solo.

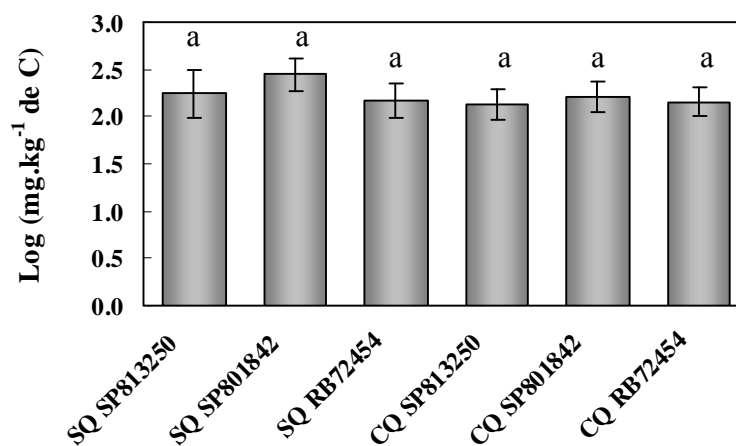


Figura 5 - CBM em solo sob cana-de-açúcar com manejo de colheita sem queima (SQ) e com queima (CQ) prévia à colheita nas variedades SP813250, SP801842 e RB72454

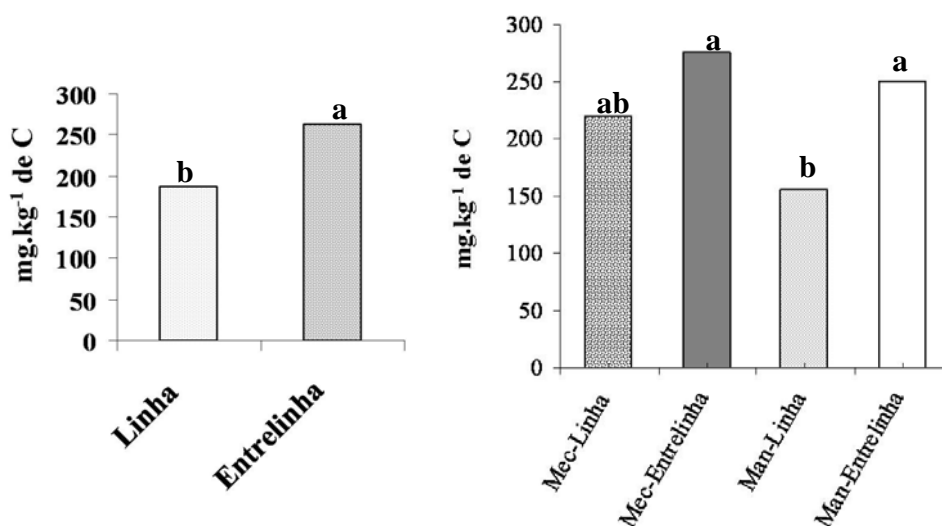


Figura 6 - CBM em solo sob a linha ou entrelinha de plantio de cana-de-açúcar com manejo de colheita mecanizado e manual

Os níveis de CBM do solo não diferiram entre os tratamentos sob manejo de colheita sem queima e com queima, tendo as médias sido de 247,60 mg.kg⁻¹ e 203,35 mg.kg⁻¹, respectivamente. Os solos sob as variedades de cana-de-açúcar também não apresentaram diferença estatística entre si para os níveis de CBM. Houve diferença significativa apenas em relação ao local de amostragem, no qual as amostras coletadas na entrelinha de plantio apresentaram média de CBM (263,25 mg.kg⁻¹) maior do que as amostras coletadas na linha (187,7 mg.kg⁻¹).

O maior teor de CBM na entrelinha de plantio ocorreu provavelmente pelo fato da presença de raízes de mais de uma planta de cana-de-açúcar, as quais acabam liberando uma maior quantidade de exudatos, uma vez que, os microrganismos respondem a grande variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes das plantas como açúcares, aminoácidos, vitaminas e polissacarídeos (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

2.4.1.4 Diversidade metabólica da microbiota

Os valores da atividade microbiana, e da diversidade metabólica, expressos como MDCC, S_s , H e E, não diferiram estatisticamente entre as duas profundidades avaliadas. Porém, foram diferentes significativamente entre os dois manejos e na interação manejo*variedade (Tabela 6). Nos tratamentos com manejo de colheita com queima, a MDCC (0,59), S_s (22,9) e H (3,10) foram, respectivamente, 47,5 %, 29,4 % e 5,8 % superiores aos tratamentos com manejo de colheita sem queima (MDCC = 0,40, S_s = 17,7 e H = 2,93) (Tabela 7). No entanto, o valor da Equitabilidade foi 6,0 % superior no manejo sem queima (E = 1,05) em relação ao com queima prévia (E = 0.99).

Os valores de MDCC e S_s foram maiores sob a variedade RB72-454 em comparação com as outras duas variedades no manejo sem queima prévia a colheita. Quando se comparam as interações de manejo de colheita com as variedades, com a mudança no manejo de colheita há uma maior mudança na MDCC, S_s , H e E no solo sob a variedade SP80-1842, onde existe diferença significativa para os 4 índices (Tabelas 6 e7), sendo que para MDCC, S_s e H, os valores foram superiores no manejo com queima.

Tabela 6 - Teste de F na análise da variância para Manejo, Variedade, Interação Manejo x Variedade e Profundidade, segundo o perfil metabólico em cana-de-açúcar

Variáveis	Causas de variação			
	Manejo	Variedade	Manejo x Variedade	Profundidade (0-10cm e 10-20cm)
MDCC	**	**	**	ns
S_s	**	**	**	ns
H	**	ns	**	ns
E	**	ns	**	ns

ns – não significativo e ** Significativo- $p < 0.01$

Tabela 7 - AWCD, Riqueza (S_s), Diversidade de Shannon (H) e Equitabilidade (E) de utilização de substratos das placas de Biolog® da comunidade microbiana edáfica sob diferentes variedades de cana-de-açúcar e dois manejos de colheita

Manejo*Variedade		MDCC	S _s	H	E
sem queima	SP81-3250	0,30 bc	16,5 b	2,86 ab	1,03 ab
	SP80-1842	0,23 c	13 b	2,79 b	1,13 a
	RB72-454	0,66 a	23,7 a	3,13 a	0,99 b
com queima	SP81-3250	0,56 ab	22 a	3,07 a	0,99 b
	SP80-1842	0,62 a	24,3 a	3,13 a	0,98 b
	RB72-454	0,60 ab	22,3 a	3,09 a	1 b

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

Na análise do perfil metabólico, deve-se considerar que o tempo de incubação pode ser pouco para haver crescimento visível em populações diluídas, indicando falsos positivos, e que as populações que crescem podem ser resultado de algumas poucas populações capazes de crescer em substratos particulares. Apesar dos problemas do cultivo de microrganismos, o método Biolog é uma ferramenta de comparação útil, porque revela diferenças consideráveis nos padrões de utilização de substratos causados por diferentes usos da terra (ZAK et al., 1994; GRAHAM; HAYNES, 2005).

Nesse trabalho, a equitabilidade (E), que mede a distribuição da quantidade utilizada de cada substrato pela microbiota, foi maior para o solo sob manejo sem queima prévia. No entanto, a queima prévia à colheita estimulou a capacidade (H) e a diversidade metabólica (S_s) microbiana do solo em relação à área de colheita sem queima (Tabela 03), apesar de existirem trabalhos que indicam diminuição da atividade e diversidade metabólica em solo que sofreram queima em sua vegetação (GRAHAM; HAYNES, 2005). Porém, esses autores avaliaram solo sob um experimento de longa duração, com vários anos de cultivo de cana-de-açúcar com ou sem queima antes da colheita. É possível que o resultado apresentado aqui, de maiores atividades e diversidades metabólicas microbianas sob cana-de-açúcar com queima, seja algo transiente. Andersson et al. (2004), estudando o efeito da queima na vegetação de savanas na África, observaram um maior teor de CBM (52%) e maior respiração basal (20%) nas parcelas com queima em relação às sem queima, 12 dias após a queimada, diminuindo os valores com o tempo.

Foram observadas, também, respostas diferentes no metabolismo microbiano

(MDCC, S_s, H e E) no solo de acordo com a variedade da cana-de-açúcar no manejo de colheita sem queima prévia (Tabelas 6 e7). Isso pode ser em decorrência de diferenças nos exsudatos ou no desenvolvimento das raízes, o que estimularia populações diferentes dentro das comunidades microbianas do solo. Indicações de que a composição e diversidade funcional microbiana foram influenciadas pela variedade vegetal também foram verificadas por Dunfield e Germida (2001), por meio da análise da composição de ácidos graxos e da utilização de substratos de C em rizosfera e raízes de *Brassica spp.* Maloney et al., (1997) sugerem que as diferenças na relação de bactérias oligotróficas e copiotróficas na rizosfera de tomate e a de alface são reflexos das diferenças qualitativas dos exsudatos ou, então, deve-se à morfologia das raízes.

2.4.1.5 Análises por métodos multivariados

Na análise discriminante das amostras de terra com as variáveis químicas no solo, ou com o consumo das fontes de C do Biolog não houve separação entre as amostras dos manejos com e sem queima. Segundo o teste de Wilks'lambda na análise discriminante, não houve diferenças significativas entre os manejos utilizando qualquer dos conjuntos de dados.

Buscando a melhor explicação da variabilidade de utilização de fontes de C pela microbiota, realizou-se uma Detrended Correspondence Analysis (DCA), feita no programa "Canoco for windows 4.5". Pela DCA, o comprimento do gradiente no eixo 1 foi menor que 3, indicando que a reposta é linear e, portanto, foi determinada a aplicação de RDA.

Quanto à utilização de fontes de C pela microbiota edáfica, os parâmetros selecionados com *Forward selection* na RDA que se relacionam e explicam significativamente a variabilidade dos dados são os teores de CO, de P e de B. Com essas três variáveis há explicação de 24,3 % da variabilidade dos dados e sugere-se separação das amostras de terra sob manejo de colheita sem queima daquelas sob manejo com queima (Figura 02). Dos 24,3 % da variabilidade explicada pela análise, 16,4 % é explicada pelo eixo 1 e 5,6 % é explicada pelo eixo 2. Pelo teste de Monte-Carlo, o primeiro eixo foi significativo ($P = 0,013$), assim como a soma de todos os eixos canônicos ($P = 0,047$), indicando que as variáveis eleitas CO, P e B no solo têm uma influência significativa na utilização de fontes de C. As amostras de terra sob cana-de-açúcar sem queima prévia à

colheita se relacionam a maiores teores de P no solo, enquanto as amostras de terra sob manejo de colheita com queima estão relacionadas a maiores teores de B no solo.

O eixo 1 não separa as amostras entre os dois manejos, mas a maioria das amostras do manejo sem queima se encontra na parte positiva, enquanto a maioria das amostras do manejo com queima está parte negativa do primeiro eixo. Já o segundo eixo da RDA separa mais do que o primeiro as amostras entre os dois manejos. Das 9 amostras do manejo sem queima, 6 estão na parte positiva do eixo 2, enquanto que 7 das 9 amostras do manejo com queima estão na parte negativa desse eixo. O centróide das amostras do manejo de colheita sem queima está nas partes positivas dos eixos 1 e 2, enquanto o centróide das amostras do manejo com queima se encontra nas partes negativas dos dois eixos (Figura 7). Considerando isso e a distribuição das amostras no gráfico da Figura 7, as amostras sem queima estão associadas ao maior consumo de Tween40, Tween80, d,l- α -glicerol fosfato, ácido d-galacturônico, d-manitol, l-treonina, ácido γ -hidroxibutírico, d-xilose, ácido d-glicose, l-eritritol, ciclodextrina, β -metil-d-glicosídeo e ácido 2-hidroxibenzóico. As amostras com queima se relacionam a maior consumo de n-acetil-d-glicosamina, α -d-lactose, l-arginina, ácido d-galacturônico, d-malico, d-celobiose, ácido d-glicosamínico, ácido itacônico, e feniletilamina, l-fenilalanina, l-serina, glicose-1-fosfato, glicogênio e ácido α -cetobutírico.

A análise discriminante dos dados de consumo de C pela microbiota edáfica e dos dados químicos em separado não permitiu agrupamento das amostras dentro de cada manejo. Mas a RDA, utilizando os dados químicos selecionados (P, B e C orgânico) e de consumo de C, indicou separação de amostras dos dois manejos (Figura 7). Portanto, o uso da análise conjunta de dados químicos e biológicos pode constituir uma ferramenta para detecção de mudanças na estrutura metabólica microbiana segundo o manejo adotado. Ainda considerando os resultados da RDA, há estímulos diferentes para as comunidades microbianas no solo a consumir determinadas fontes de C, de acordo com o manejo de pré-colheita.

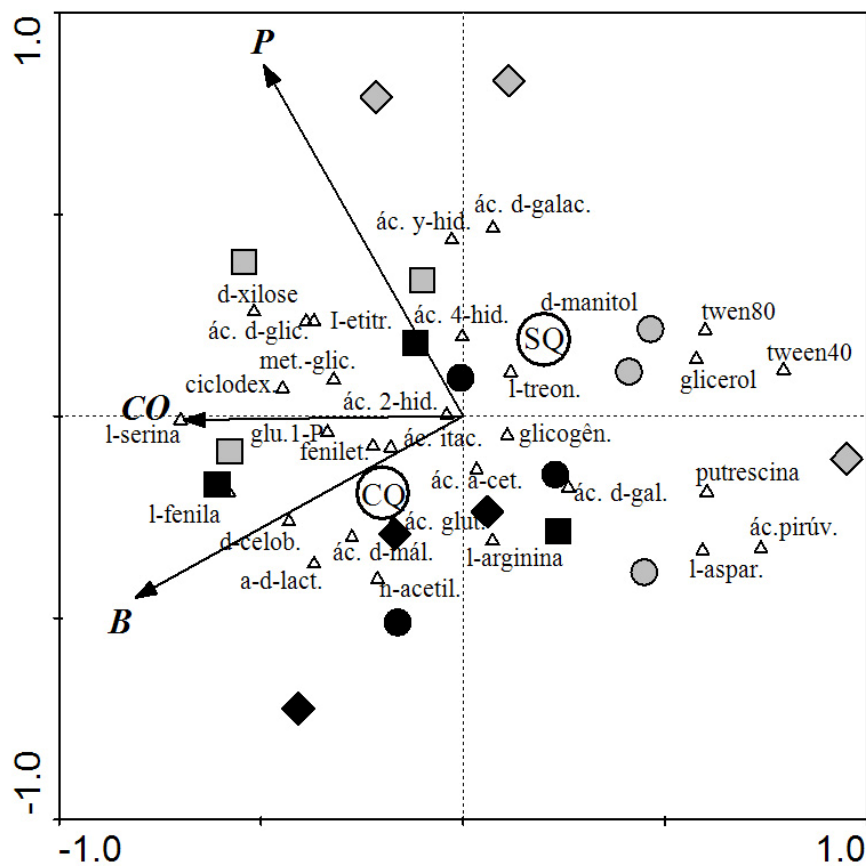


Figura 7 - Triplot de fontes de C e variáveis do solo da Análise de Redundância (RDA). $P = 0.013$ para o primeiro eixo canônico, $P = 0,047$ para a soma dos eixos, segundo o teste de Monte Carlo. (SQ) - centróide das amostras sob manejo sem queima; (CQ) - centróide das amostras sob manejo com queima. ○, ◇, □ - amostras SQ e ●, ◆, ■ - amostras CQ, variedades SP813250, SP801842 e RB72454, respectivamente

2.4.1.6 Estrutura das comunidades microbianas

Para investigar se as alterações na diversidade metabólica do solo estavam associadas a alterações na estrutura das comunidades bacterianas, utilizou-se PCR-DGGE da região V3 do gene do rRNA 16S de amostras de terra sob a variedade de cana-de-açúcar SP801842. Esta variedade foi selecionada por apresentar alteração na capacidade e diversidade metabólica microbiana entre os manejos sem queima e com queima prévia à

colheita (Tabela 7). No total, a análise por DGGE possibilitou detectar 120 bandas com diferentes mobilidades nos géis de poliacrilamida (Figura 8). A ausência ou presença de bandas foi utilizada para comparar a estrutura das comunidades bacterianas das diferentes amostras. O agrupamento hierárquico mostrou que as amostras não se agrupam em função dos fatores profundidade ou manejo de colheita (Figura 9). No entanto, houve agrupamento das amostras coletadas na profundidade de 0-10 cm sob manejo sem queima.

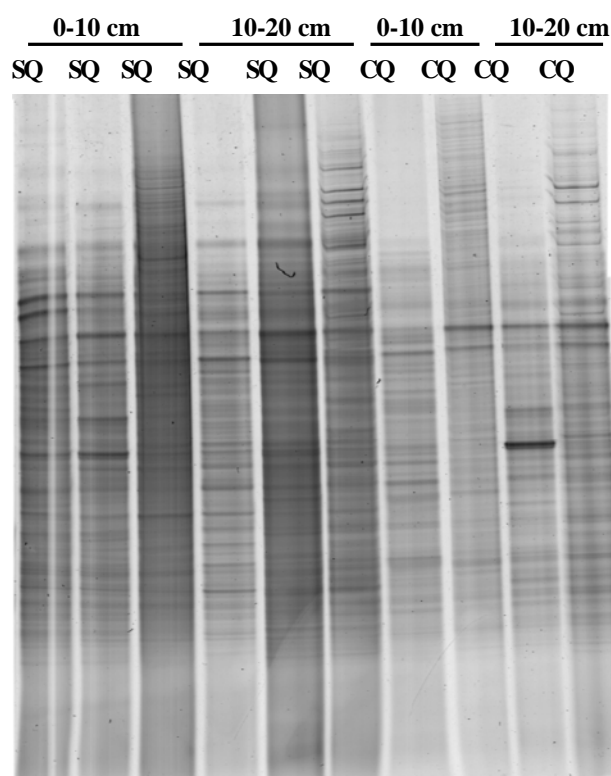


Figura 8 - DGGE de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra sob cultivo de cana-de-açúcar SP801842 com manejo de colheita sem queima (SQ) e com queima (CQ) prévia, nas camadas 0-10 cm e 10-20 cm

A mudança de MDCC, Ss, H e E no solo detectada sob a variedade SP801842 não é acompanhada de alteração da estrutura da comunidade bacteriana detectada por DGGE, no qual não houve tendências de agrupamento de amostras dentro de cada manejo, após a primeira colheita, por meio da análise de agrupamento e da PCoA/RDA. Mudanças encontradas na diversidade funcional nem sempre são acompanhadas por alterações verificadas na estrutura genética das comunidades de microrganismos (SMALLA et al., 1998). Isso pode ser devido à presença de organismos em estágios de dormência ou latentes

em determinada situação, os quais podem se tornar ativos quando se altera o ambiente. Uma transição reversível entre estado ativo e dormente de microrganismos no solo foi verificada por Stenström, Svensson e Johansson (2001). Esses autores adicionaram 3 quantidades de glicose no solo em pré-incubação, avaliaram a cinética de respiração e propuseram que a dinâmica habitual da biomassa microbiana é uma oscilação entre os estados fisiológico ativo e dormente, enquanto que um crescimento microbiano significativo ocorre quando há aporte suficiente de substrato. No entanto, a real razão para esse resultado nesse trabalho ainda precisa ser mais bem investigada.

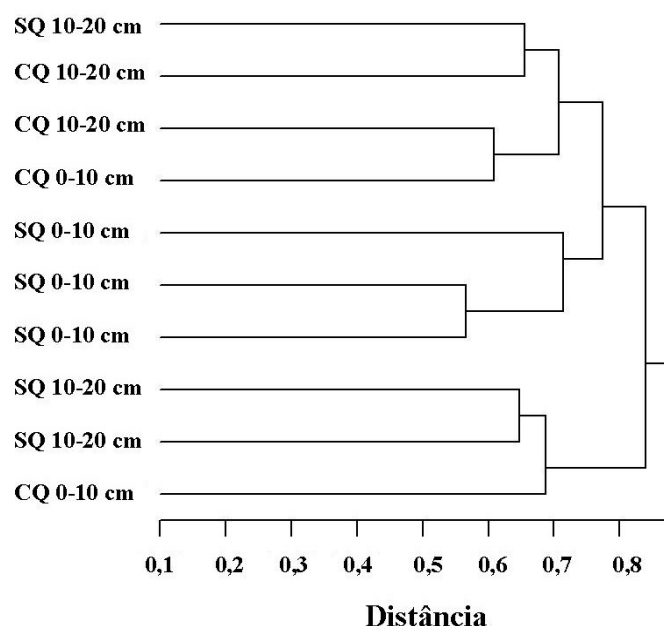


Figura 9 - Agrupamento hierárquico do DGGE de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra sob cultivo de cana-de-açúcar SP801842 com manejo de colheita sem queima (SQ) e com queima (CQ) prévia, nas camadas 0-10 cm e 10-20 cm

Empregou-se a análise de PCoA/RDA para relacionar as coordenadas dadas pelo DGGE com as variáveis químicas e metabólicas do solo. Nessa análise, a ordenação das amostras pela RDA foi feita a partir das coordenadas geradas pela PCoA, na qual se utilizaram os dados de presença e ausência de *amplicons*. Não houve agrupamento das amostras em função do manejo de colheita (Figura 10), nem significância na distribuição das amostras pelo teste de Monte-Carlo. Das variáveis analisadas, a saturação da CTC por bases (V%) foi a que apresentou menor valor de P (0,66) no eixo canônico e foi

representada no gráfico da Figura 10. O primeiro e os segundo eixo canônico explicam 11,1 % cada.

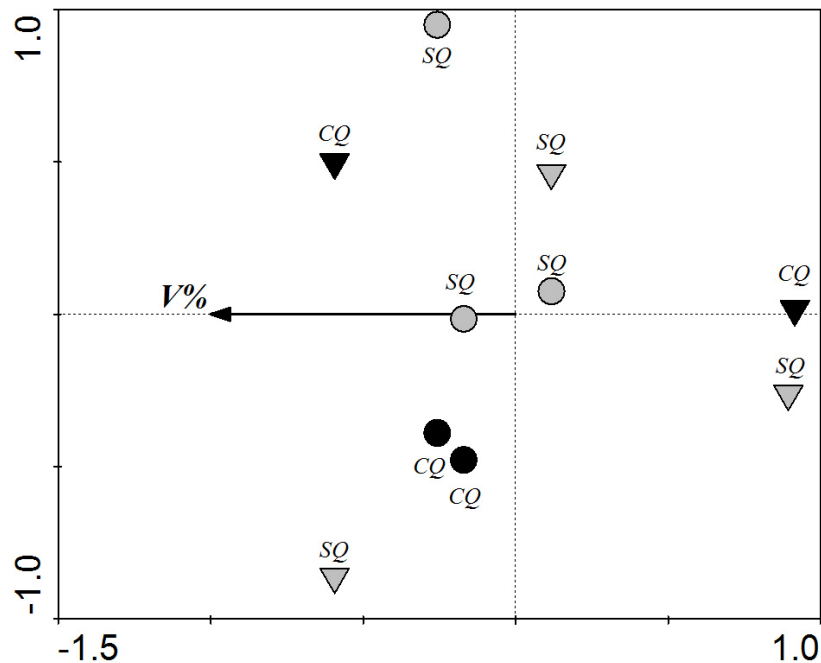


Figura 10 - Biplot da Análise de Redundância (RDA) a partir das coordenadas calculadas pela PCoA entre amostras sob manejo de colheita sem queima (SQ) e com queima (CQ) de cana-de-açúcar e a variável saturação por bases da CTC do solo. ○, ● - amostras de SQ e CQ (profundidade 0-10 cm), respectivamente; ▽, ▼ - amostras de SQ e CQ (profundidade 10-20 cm), respectivamente

As pequenas alterações observadas na estrutura das comunidades de *Bacteria* no solo, as quais não permitiram discriminação entre os dois manejos, podem ter como explicação o fato de ter ocorrido apenas uma queima para a colheita após a instalação do experimento. Portanto, os efeitos da adição de palhada no solo não causariam mudança na estrutura bacteriana logo no primeiro corte para a colheita.

2.4.2 Experimento 2

Com o intuito de verificar o efeito da aplicação de uréia sobre a comunidade microbiana do solo, foram comparadas as estruturas das comunidades bacterianas e diversidade de bactérias oxidadoras de amônio, e a correlação dessas com atributos

químicos do solo, em solos com diferentes doses de N. Foram instaladas duas áreas experimentais no estado de São Paulo, uma na Usina São Luiz (USL), localizada no município de Pirassununga, e outra na Usina Santa Adélia (USA), situada no município de Jaboticabal.

2.4.2.1 Produção de colmos por hectare

No experimento da USL houve aumento na tonelada de colmos por hectare (TCH) nos tratamentos que receberam N no plantio ($p < 0,05$) (Tabela 8). Korndörfer et al. (1997) e Trivelin et al. (2002), avaliando o efeito de doses de N (30, 60 e 120 kg de N ha⁻¹ e 30, 60 e 90 kg de N ha⁻¹, respectivamente) no plantio, também constataram resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada. Nesses experimentos foram observados aumentos lineares significativos na TCH em resposta a adubação nitrogenada de plantio. Os primeiros autores verificaram que para cada 10 kg de N ha⁻¹ aplicado no plantio, houve um incremento médio de 3,5 TCH.

Em contraste, na USA não houve diferença significativa na produção de colmos em função das doses de N aplicadas no plantio (Tabela 8). Em experimentos realizados por Cantarella e Raij (1986) e Azeredo et al. (1986) também não foram observadas resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada de plantio. Segundo Franco (2008), o elevado erro experimental tem feito com que estudos com pequenas respostas em produção, em razão da adubação nitrogenada, não atinjam significância estatística.

Tabela 8 - Produção de colmos (TCH), em função de doses de N aplicado no plantio da cana-de-açúcar, nas Usinas São Luiz (USL) e Santa Adélia (USA)

Dose de N	USL	USA
kg ha ⁻¹	t ha ⁻¹	
0	134	145
40	142	144
80	139	147
120	141	146
CV (%)	2,66	3,46
Teste <i>F</i>	1,94*	1,25 ^{ns}

A resposta da cana-planta à adubação com N, em geral, apresenta uma série de dificuldades para interpretação, devido ao comportamento complexo desse nutriente no solo, aliado ao fato de não existir um método analítico eficiente e viável economicamente para a determinação do N disponível no solo (FRANCO, 2008). No setor canavieiro, a adubação nitrogenada no plantio ainda é uma questão não esclarecida.

No presente trabalho, a resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada pode estar associada ao tipo de solo. Na USL, o experimento foi instalado sobre um LATOSSOLO VERMELHO AMARELO eutrófico, enquanto que na USA o experimento foi instalado sobre um LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico. Azeredo et al. (1994) obtiveram aumentos altamente significativos na produtividade da cana-de-açúcar com adição de 180 kg de N ha⁻¹ num CAMBISSOLO, enquanto que o mesmo não foi observado em LATOSSOLOS. A cana-planta pode apresentar resposta à adubação com N em solos eutróficos, solos onde se cultiva a cana-de-açúcar pela primeira vez e em solos sob cultivo mínimo (ORLANDO FILHO, 1993). Segundo a classificação dos solos das duas áreas experimentais (OTTO, 2007), na USL o solo é eutrófico e na USA é distrófico, portanto, em razão desse fato, o experimento da USL teria maior probabilidade de apresentar resposta à adubação nitrogenada, muito embora antes da implantação, as áreas foram cultivadas com cana-de-açúcar, por vários anos.

2.4.2.2 Atributos químicos do solo

Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos atributos químicos dos solos avaliados, nas duas áreas (Tabela 9), em função da adubação nitrogenada. Isso pode ter ocorrido, pois as amostragens de solo para a caracterização química foram realizadas após o preparo mecânico e correção química do solo com calcário, tornando as parcelas mais homogêneas quimicamente.

Tabela 9- Atributos químicos do solo para a profundidade de 0-20 cm, em função de doses de N aplicado no plantio da cana-de-açúcar, nas Usinas São Luiz (USL) e Santa Adélia (USA)

Dose de N kg ha ⁻¹	M.O. g dm ⁻³	pH	P mg dm ⁻³	K ----- mmolc dm ⁻³	Ca	Mg	H+Al	S.B.	C.T.C.	V %	S mg dm ⁻³
USL											
0	21	5.9	6	1.7	33	8	15	42.7	57.9	74	2
40	21	5.9	5	1.8	34	9	15	44.6	59.4	75	1
80	21	5.9	6	1.9	35	9	15	44.9	59.7	75	2
120	22	5.9	6	2.1	38	9	15	49.4	64.6	76	3
USA											
0	21	5.4	13	2.9	20	11	23	33.6	56.8	60	2
40	21	5.5	16	3.1	24	13	21	39.1	59.9	65	2
80	22	5.4	15	3.4	20	11	22	34.9	57.1	61	3
120	22	5.5	15	3.3	21	12	21	35.8	57.1	63	2

2.4.2.3 Biomassa microbiana do solo

Para avaliar o efeito das doses de N na biomassa microbiana do solo (BMS), foram determinados os teores de carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM). Como dito anteriormente, a BMS corresponde à parte viva da matéria orgânica do solo (MOS) e é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes como N, S e P, estocagem de C e fluxo de energia no solo, influenciando a transformação da MOS (FEIGL e al., 1998; MOREIRA;SIQUEIRA, 2006). Pela sua importância e pelo fato de ser sensível a práticas agrícolas, tais como preparo mecânico, adubação e cobertura vegetal, a determinação da BMS vem sendo bastante utilizada como indicador de qualidade do solo.

Vários trabalhos têm mostrado uma diminuição nos teores de BMS com a aplicação de adubos nitrogenados (ODONELL et al., 2001; MORAIS, 2004; COSER, 2006), no entanto, nesse experimento não foi observada diferença significativa nos teores de CBM e NBM no solo sob os diferentes tratamentos (doses de N), nas duas áreas experimentais (USL e USA) (Figuras 11 e 12).

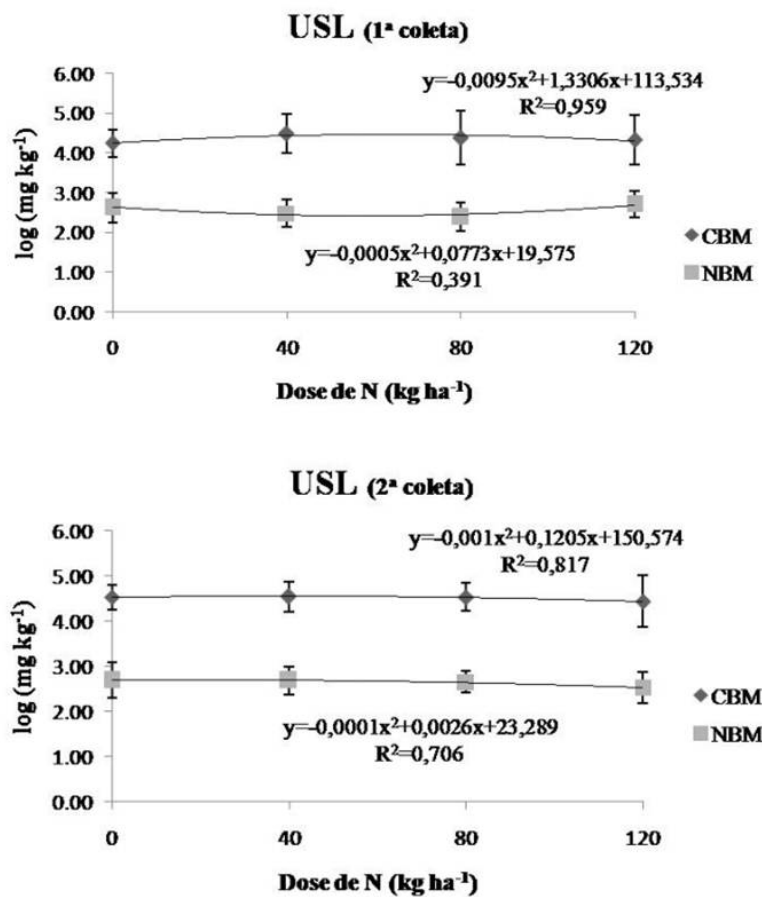


Figura 11 – Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM) em função de doses de N aplicado no plantio da cana-de-açúcar, nas Usinas São Luiz (USL), e duas coletas (1ª coleta em Set /05 e 2ª coleta em Jun /06)

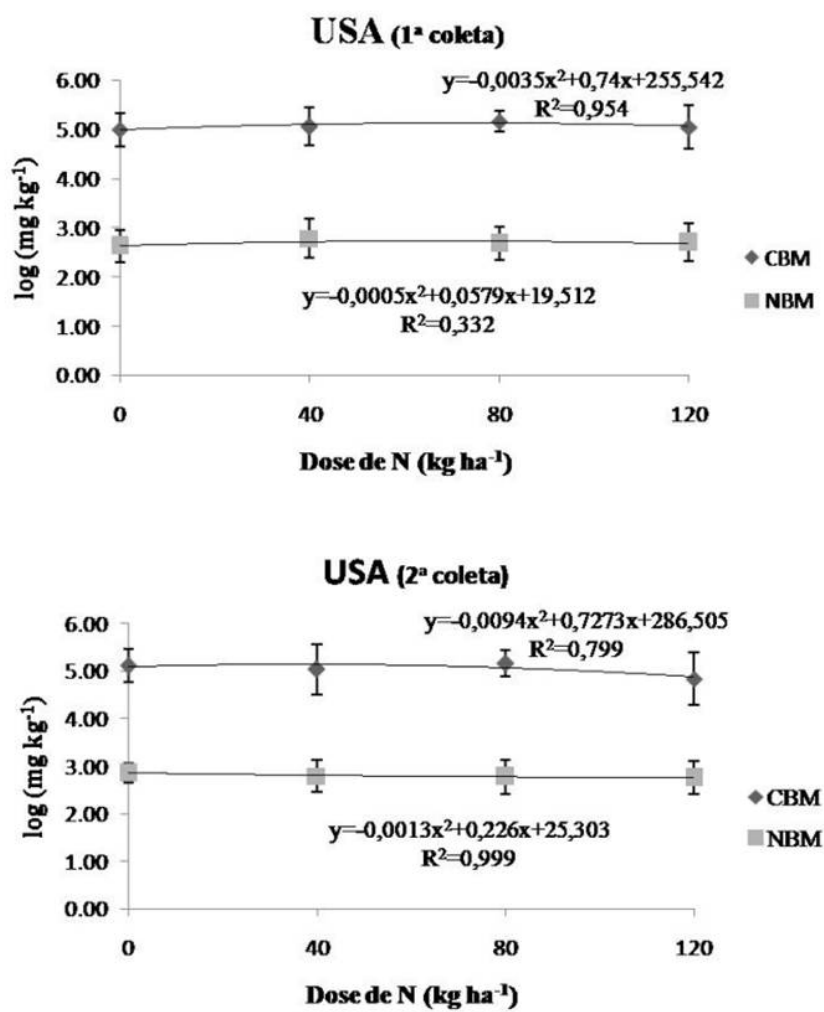


Figura 11 – Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM) em função de doses de N aplicado no plantio da cana-de-açúcar, na Usina Santa Adélia (USA), em duas coletas (1ª coleta em Nov/05 e 2ª coleta Ago/06)

As amostragens de solo foram realizadas seis meses (1ª coleta) e um ano e seis meses (2ª coleta) após a aplicação de N na área. Esse tempo pode ter sido suficiente para que a comunidade microbiana do solo tenha retornado ao seu estado inicial, pois, após a introdução de um distúrbio, a BMS sofre flutuações até atingir um novo equilíbrio (MENGEL, 1996). Outra possível explicação seria a de que o preparo mecânico do solo realizado na instalação do experimento tenha influenciado mais na BMS do que as doses de N, uma vez que esse preparo foi igual para todos os tratamentos. Allton (2006) investigando mudanças na comunidade microbiana do solo em razão do manejo, observou redução no tamanho da comunidade microbiana e decréscimo na diversidade de fungos no manejo convencional, comparado com o sistema de plantio direto.

Morais (2004) não encontrou diferença significativa nos teores de CBM e NBM em relação às doses de N aplicadas ao solo (0, 60 e 120 kg de N ha⁻¹) com manejo convencional. No entanto, a BMS aumentou no sistema de plantio direto. Perez, Ramos e McManus (2005), Stockdale e Brookes (2006) e Figueiredo et al. (2007), também observaram diminuição nos teores de BMS, em solos em que houve revolvimento, comparando com mata nativa e plantio direto.

Apesar de não existir diferença significativa entre os tratamentos, houve diferença significativa nos teores de NBM, na média geral dos tratamentos, em relação à posição de amostragem, na USA, nas duas épocas de coleta (Figura 12). Em ambos os casos, o NBM na linha de plantio foi significativamente maior do que na entrelinha ($p < 0,01$).

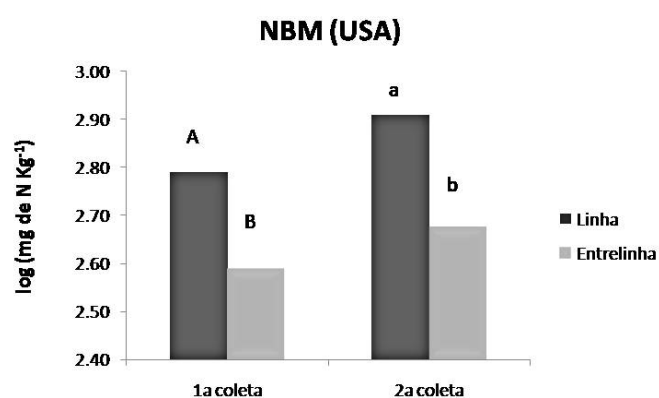


Figura 13 – Nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) em relação ao local de amostragem, na Usina Santa Adélia (USA), e duas coletas (1ª coleta em Nov/05 e 2ª coleta em Ago/06)

O maior teor de NBM na linha de plantio pode ser uma consequência da aplicação

do adubo nitrogenado nesse local (sulco de plantio), aumentando a quantidade de N no solo e conseqüente imobilização pela BMS. A imobilização do N pode ser considerada um fator positivo, pois pode evitar a perda do nutriente sob a forma de nitrato ou óxidos de nitrogênio. Os nutrientes imobilizados pela comunidade microbiana podem atingir valores elevados, mas apesar de diminuir a eficiência imediata do adubo, a sua reciclagem e liberação são mais rápidas do que as de outras frações da matéria orgânica do solo (VARGAS; SELBACH; SÁ, 2005). À medida que ocorre a morte dos microrganismos, estes são rapidamente mineralizados pelos microrganismos remanescentes, liberando os nutrientes e podendo suprir uma quantidade significativa de N para as plantas (VARGAS; SCHOLLES, 1998).

Ernani et al. (2005) afirmam que a quantidade e a época em que os adubos nitrogenados são aplicados ao solo afetam a imobilização e liberação de N. No entanto, não foi observado aumento significativo nos teores de NBM na linha de plantios nas áreas experimental da USL como na USA. Mais uma vez o tipo de solo pode estar influenciando numa maior atividade microbiana. A adição de adubos nitrogenados aumentou em aproximadamente duas vezes a atividade da BMS em um NITOSSOLO, em comparação com a testemunha sem N, porém o mesmo não aconteceu em um NEOSSOLO, no qual não houve diferença estatística entre a testemunha e o tratamento com adubação com N, em experimento realizado por Ernani et al. (2005).

Também não houve diferença significativa para a relação entre CBM e carbono orgânico total (COT) (dados não apresentados). Segundo Sparling (1992), variações dessa relação podem ser indicativo de eficiência da conversão do COT em CBM, estabilização do COT na fração mineral do solo e as suas perdas.

Resposta quadrática às doses de N foram observadas para a relação CBM:NBM USL (Figura 14). Os tratamentos com doses intermediárias de N (40 e 80 kg de N ha⁻¹) tiveram relação CBM:NBM significativamente maior ($p < 0,01$) do que o tratamento em que não foi aplicado N no plantio e naquele em que foi adicionado 120 kg de N ha⁻¹. A relação CBM:NBM do solo está intimamente relacionada com a composição qualitativa da biomassa microbiana do solo (BONDE; ROSSWALL; VICTORIA, 1991; GARCIA; RICE, 1994; DUMONTET et al., 1996) e assim alterações nessa relação podem significar alterações qualitativas da biomassa microbiana.

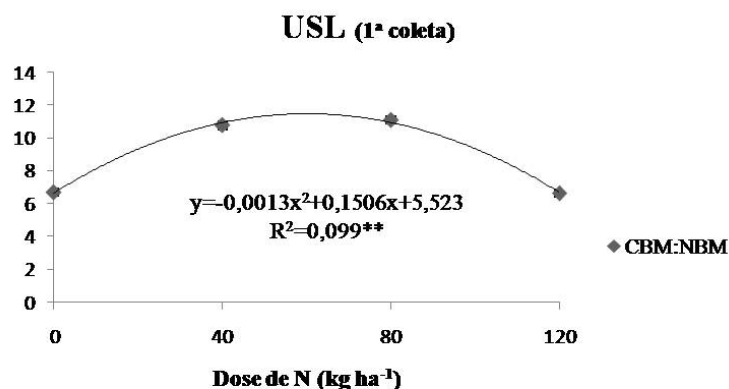


Figura 14 – Relação entre carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM:NBM) em função de doses de N aplicado no plantio da cana-de-açúcar, na Usina Santa Luiz (USL), na 1ª coleta (Set/05)

2.4.2.4 Estrutura das comunidades microbianas

Atividades antrópicas podem afetar o funcionamento dos ecossistemas e reduzir sua biodiversidade, resultando em desequilíbrios ecológicos de conseqüências imprevisíveis, e na extinção de espécies essenciais à manutenção do ecossistema (LAMBAIS et al., 2005). No solo, a diminuição da diversidade microbiana pode resultar em diminuição da ciclagem de nutrientes e crescimento de plantas (REBER, 1992).

Para verificar se há mudanças na estrutura das comunidades bacterianas no solo devido à aplicação de adubos nitrogenados para a cultura da cana-de-açúcar, foi utilizado PCR-DGGE da região V3 do gene rRNA 16S de bactérias, pois essa técnica permite monitorar as comunidades bacterianas no solo e detectar alteração em sua estrutura em função de impactos antrópicos (VAN ELSAS et al., 1998).

Foram selecionadas para a análise por PCR-DGGE, amostras da profundidade 0-10 cm, na linha de plantio, das duas coletas realizadas nas áreas experimentais, nos tratamentos com doses de N e no controle sem a adição do adubo. As imagens dos géis e análise discriminante com base no perfil de *amplicons* do gene rRNA 16S das amostras são mostrados nas Figuras 15, 16, 17 e 18.

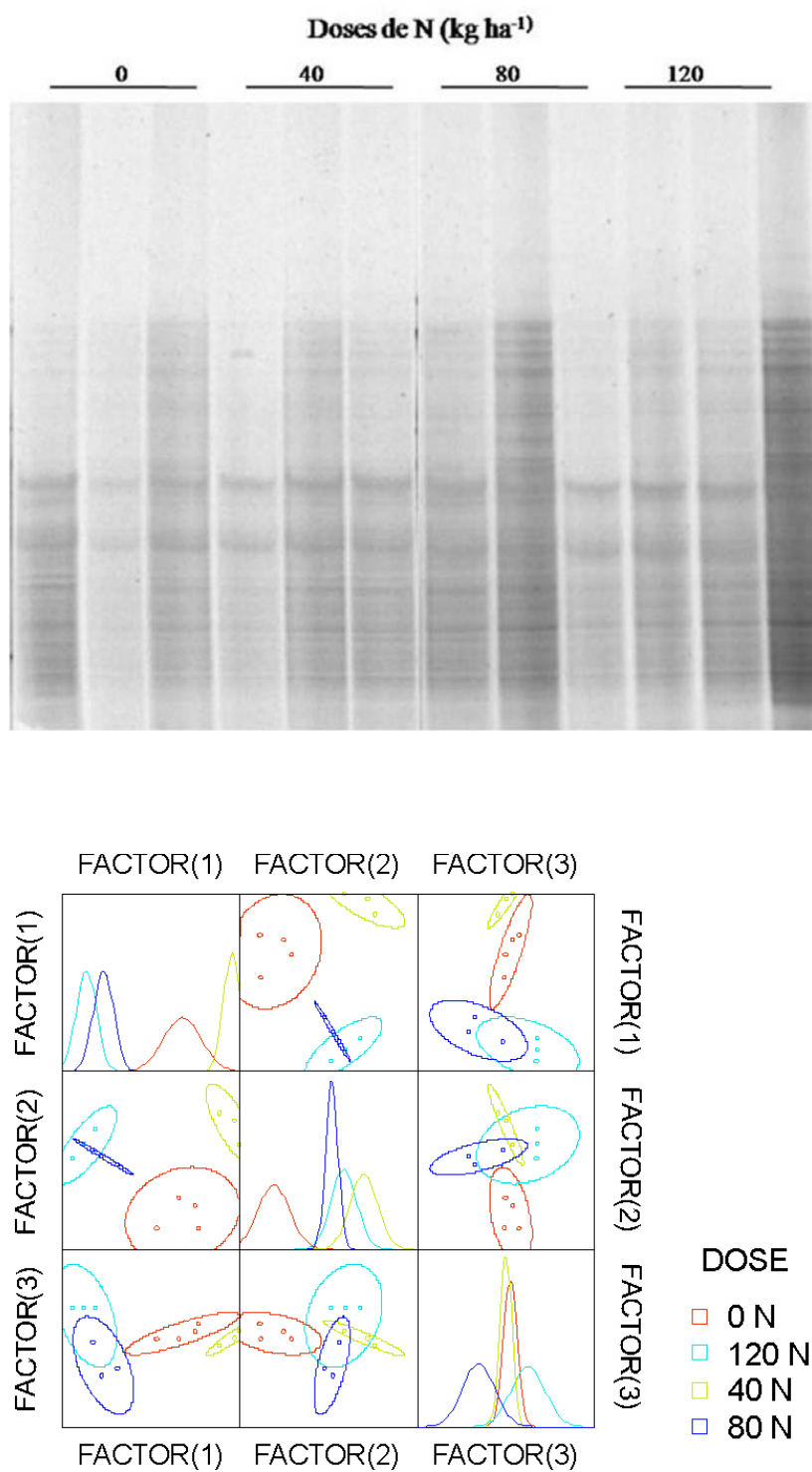


Figura 15 – DGGE e análise discriminante de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina São Luiz (USL), na 1ª coleta (Set/05). Os fatores 1, 2 e 3 explicam 70,9 %, 22,7 % e 6,4 % da variabilidade, respectivamente

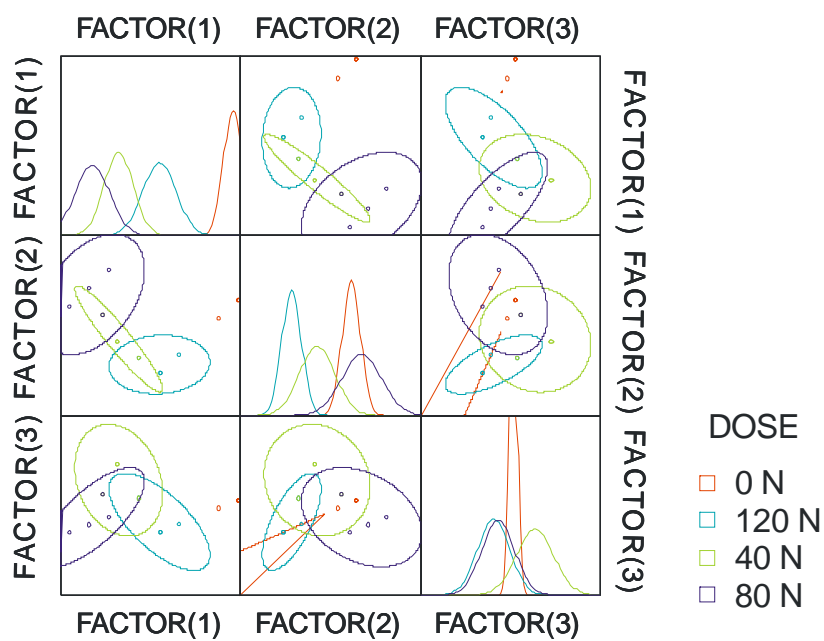
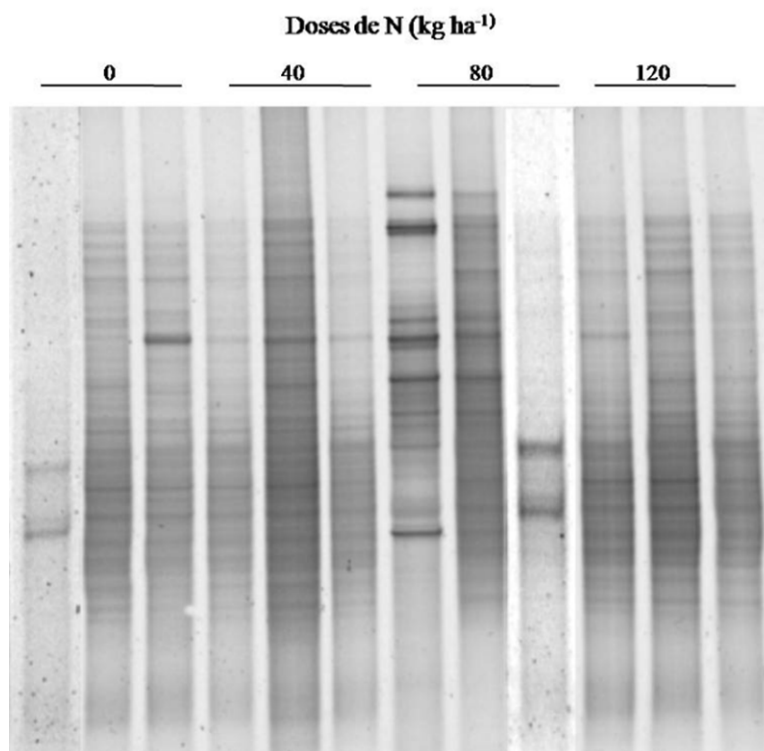


Figura 16 – DGGE e análise discriminante de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina São Luiz (USL), na 2^a coleta (Jun/06). Os fatores 1, 2 e 3 explicam 67,1 %, 25,5 % e 7,4 % da variabilidade, respectivamente

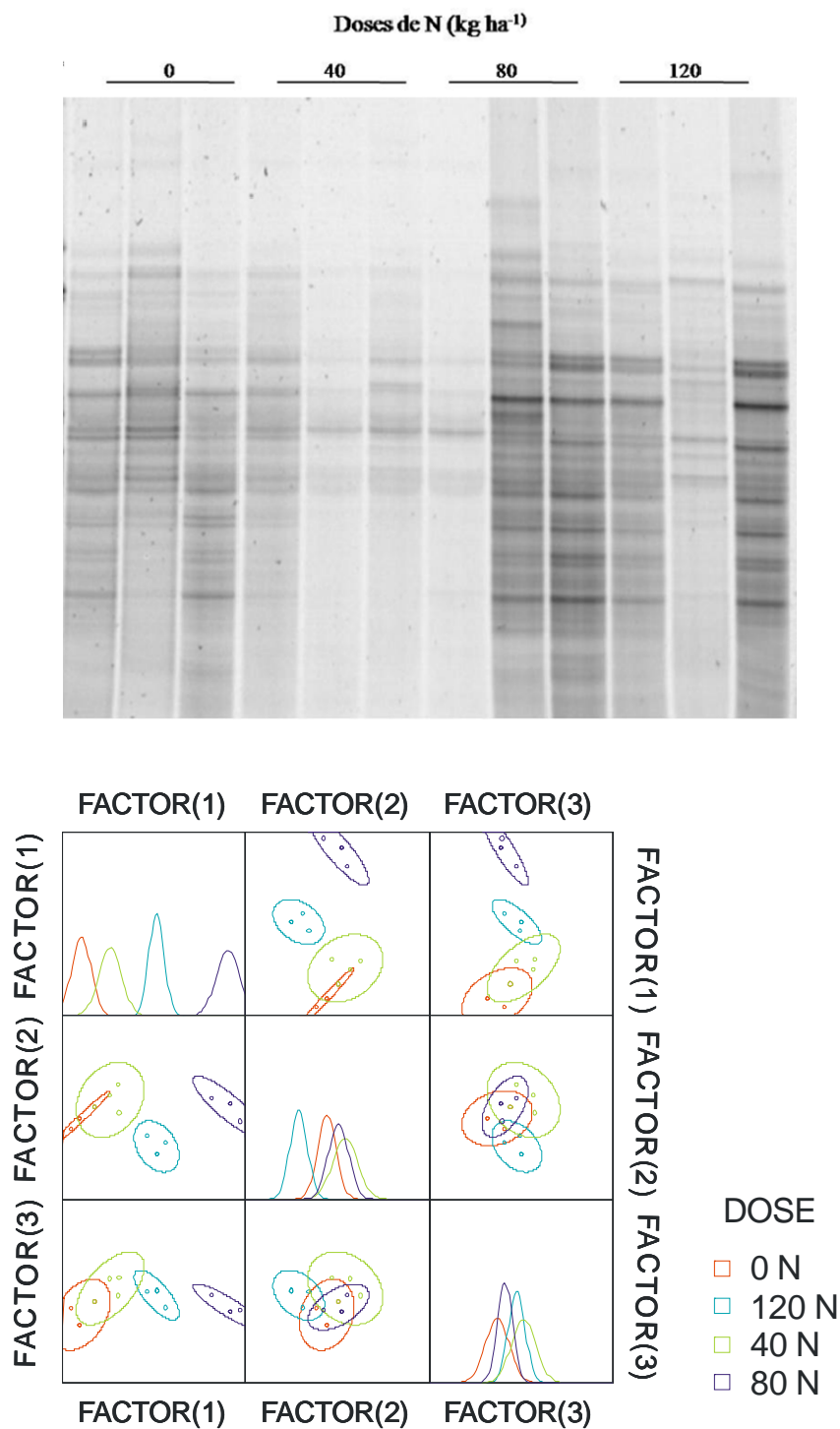


Figura 17 – DGGE e análise discriminante de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina Santa Adélia (USA), na 1ª coleta (Nov/05). Os fatores 1, 2 e 3 explicam 72,3 %, 21,9 % e 5,8 % da variabilidade, respectivamente

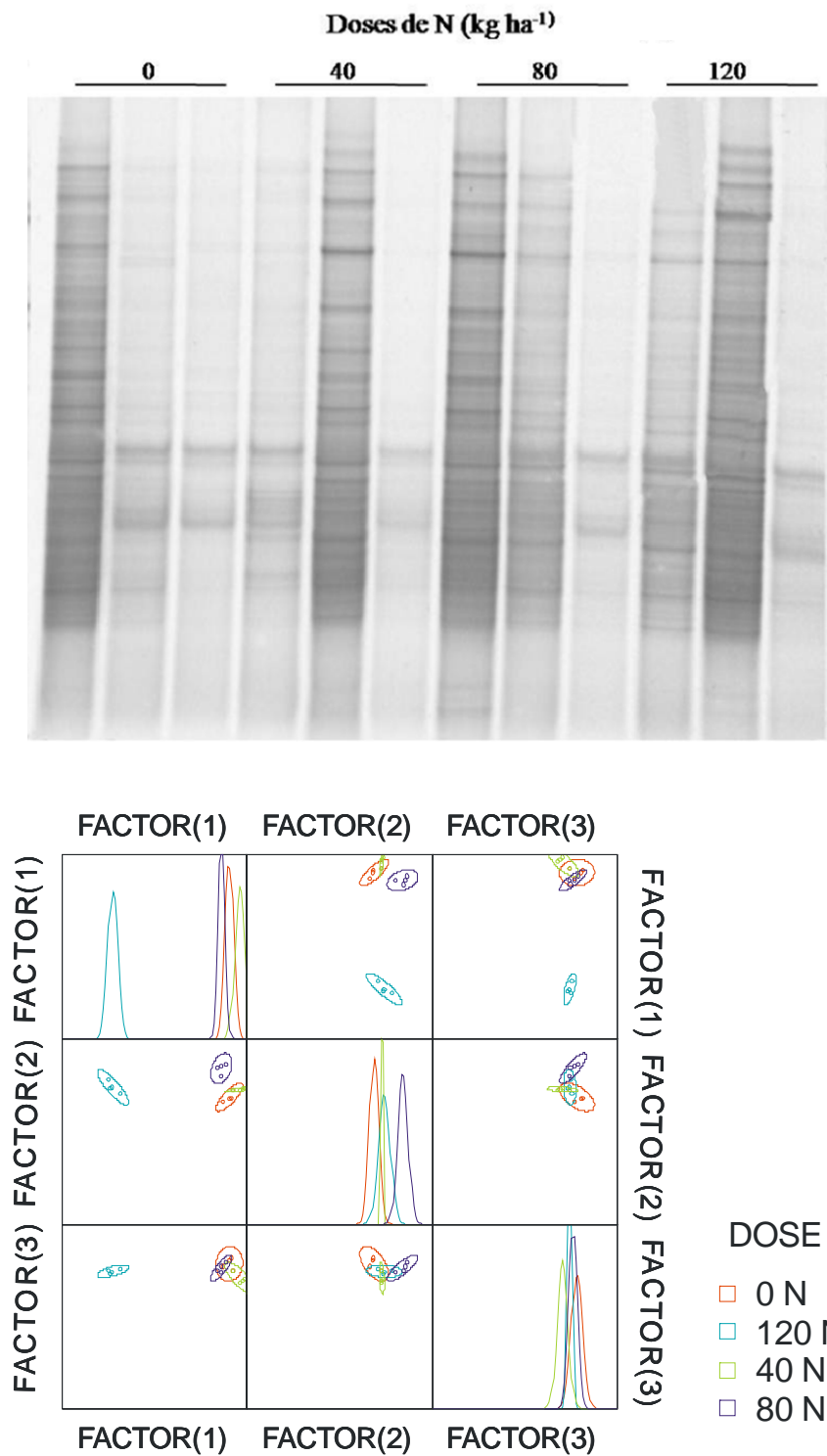


Figura 18 – DGGE e análise discriminante de rDNA 16S de *Bacteria* de amostras de terra em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina Santa Adélia (USA), na 2ª coleta (Ago/06). Os fatores 1, 2 e 3 explicam 58,3 %, 31,1 % e 10,6 % da variabilidade, respectivamente

Na análise discriminante dos *amplicons* obtidos no DGGE houve agrupamento dos tratamentos em função das doses de N, tanto na USL como na USA, nas duas coletas, pelos fatores 1 e 2.

Na USL, os tratamentos (40, 80 e 120 kg de N ha⁻¹) separaram do controle sem N, nas duas coletas. Na 1^a coleta (Figura 15), as amostras dos solos que receberam 80 e 120 kg de N ha⁻¹ não separaram, indicando uma estrutura da comunidade bacteriana semelhante para as maiores doses de N aplicadas no solo. Resultado parecido foi observado na 2^a coleta (Figura 16), no entanto nessa coleta não houve separação entre as doses de N, houve separação apenas da testemunha sem a adição de N. Esses resultados mostram que a adubação nitrogenada alterou a estrutura da comunidade de *Bacteria* na USL.

A estrutura das comunidades de bactérias na USL e USA não apresentaram o mesmo comportamento. Na USA só foi observada alteração na estrutura da comunidade de bactérias com adição das maiores doses de N (80 e 120 kg de N ha⁻¹) ao solo, que separaram do tratamento com aplicação de 40 kg de N ha⁻¹, o qual não separou do controle sem N, nas duas épocas de coleta.

È possível afirmar que em ambas as áreas houve alteração da estrutura das comunidades bacterianas em função das doses de N aplicadas ao solo. Alguns trabalhos tem mostrado alteração da comunidade bacteriana do solo devido a utilização de adubos nitrogenados.

Utilizando a técnica PCR-DGGE para avaliar o efeito de adubos orgânicos e inorgânicos sobre a comunidade de bacteriana do solo, Ruppel et al. (2007) observaram agrupamento das comunidades de *Bacteria* com adição de 120 kg de N ha⁻¹ ao solo e mostraram uma composição similar da comunidade bacteriana.

Talvez o pouco tempo após a instalação do experimento e aplicação de N, bem como a correção física e química do solo tenham influenciado na similaridade das comunidades bacterianas entre os tratamentos. Mudanças na atividade e composição das comunidades bacterianas do solo em razão da aplicação de adubos nitrogenados foram observadas por Enwall et al. (2007), em experimento após vinte anos e atribuíram essa mudança ao efeito indireto causado pela acidificação do solo ocorrida pelo uso desses adubos. Frey et al. (2004) também notaram mudanças nas comunidades microbianas do

solo devido o enriquecimento de N em florestas ao longo do tempo, diminuindo as taxa de decomposição e alterando o ciclo do N.

2.4.2.5 Análises por métodos multivariados

Assim como no experimento 1, foi realizada uma análise multivariada conjunta dos dados de DGGE, os atributos químicos do solo, CBM e NBM, buscando uma melhor explicação dos dados (Figuras 19, 20, 21 e 22) utilizando o programa “Canoco for Windows 4.5”. Foi utilizado *Forward selection* na RDA para selecionar quais variáveis se relacionam e explicam significativamente a variabilidade dos dados obtidos no com DGGE.

Na 1ª coleta na USL, as variáveis que se relacionaram com os dados de DGGE foram V%, Ca, SB, CTC, S, P, MO e CBM (Figura 19), com essas variáveis há explicação de 85,8 % da variabilidade dos dados, sendo 73,8 % explicada pelo eixo 1 e 12 % pelo eixo 2. Pelo teste de Monte-Carlo, o primeiro eixo foi significativo ($p=0,006$), assim como a soma de todos os eixos canônicos ($p=0,002$), indicando que as variáveis eleitas tem influencia significativa na estrutura da comunidade bacteriana do solo. O Ca, S, CBM e pH se relacionaram com os dados (Figura 20), explicando 34,2 % da variabilidade, sendo 26,1 % explicada pelo eixo 1 e 8,1 % pelo eixo 2, na 2ª coleta na USL. Na USA, na 1ª coleta, 95 % da variabilidade dos dados foram explicados pelo Ca, MO, CBM e pH (Figura 21), que se relacionaram com a estrutura da comunidade bacteriana, com essas variáveis há explicação de, sendo 52,8 % explicada pelo eixo 1 e 42,2 % pelo eixo 2. Na 2ª coleta na USA, apenas o K e CBM se relacionaram com o DGGE (Figura 22), explicando 51,9 % da variabilidade dos dados, sendo 44,6 % explicada pelo eixo 1 e 7,3 % pelo eixo 2.

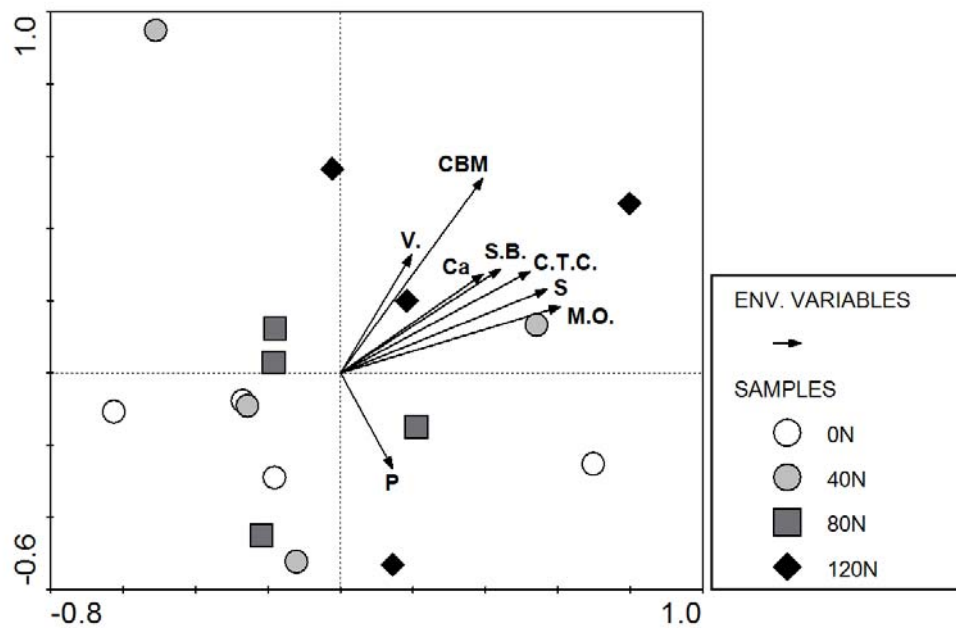


Figura 19 - Biplot do DGGE e variáveis do solo da análise de Redundância (RDA) a partir das coordenadas calculadas pela PCoA em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina São Luiz (USL), na 1ª coleta (Set/05).

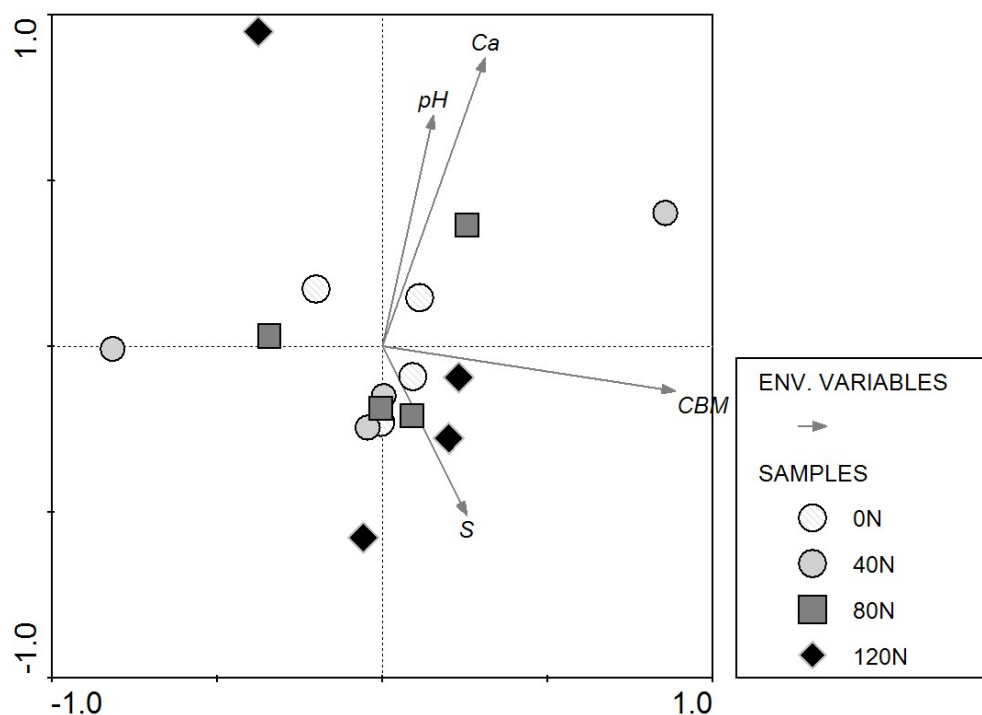


Figura 20 - Biplot do DGGE e variáveis do solo da análise de Redundância (RDA) a partir das coordenadas calculadas pela PCoA em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina São Luiz (USL), na 2ª coleta (Jun/06)

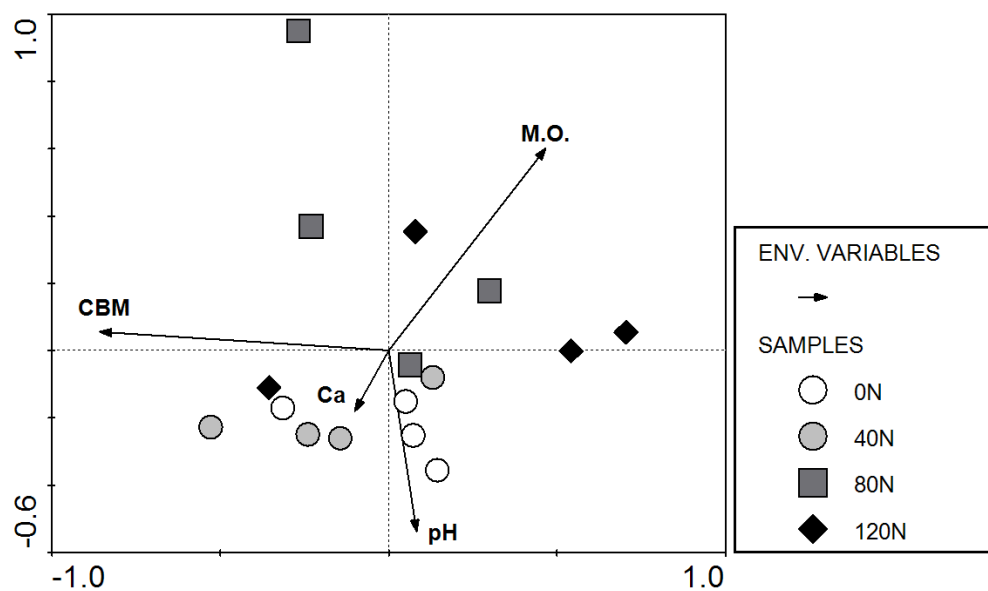


Figura 21 - Biplot do DGGE e variáveis do solo da análise de Redundância (RDA) a partir das coordenadas calculadas pela PCoA em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina Santa Adélia (USA), na 1ª coleta (Nov/05)

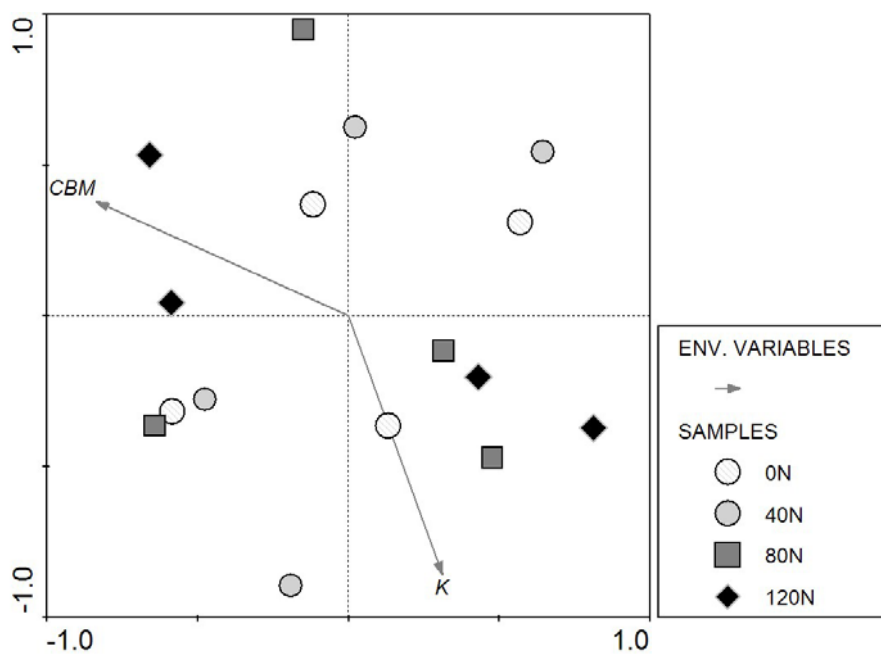


Figura 22 - Biplot do DGGE e variáveis do solo da análise de Redundância (RDA) a partir das coordenadas calculadas pela PCoA em função de doses de N aplicado no sulco de plantio da cana-de-açúcar na Usina Santa Adélia (USA), na 2ª coleta (Ago/06)

Nas primeiras coletas realizadas, tanto na USL como na USA, três das quatro amostras do tratamento no qual foram adicionados 120 kg de N ha⁻¹ estão na parte positiva do eixo 2, ao contrário da testemunha sem aplicação do adubo nitrogenado, em que todas as amostras se localizam na parte negativa desse eixo. O mesmo foi observado para a dose 80 kg de N ha⁻¹, na USA, na 1^a coleta, que juntamente com a dose 120 kg de N ha⁻¹ tiveram três das quatro amostras na parte positiva do eixo 2 e o tratamento com aplicação de 40 kg de N ha⁻¹, assim como a testemunha sem adição de N estão na parte negativa do eixo. Esses resultados indicam uma possível separação entre os tratamentos com a maior dose de N aplicada no plantio (80 e 120 kg de N ha⁻¹) e o tratamento com 40 kg de N ha⁻¹ e a testemunha sem adição de N. Os resultados corroboram os resultados obtidos pela análise discriminante dos dados de DGGE. No entanto, na análise discriminante, há separação dos tratamentos em função das doses de N aplicadas ao solo nas duas épocas de coleta. Como dito anteriormente, a RDA é baseada na análise de componentes principais (PCA), porém, ao contrário desta, a ordenação das amostras é condicionada diretamente pelas variáveis ambientais. Assim, permite medida direta da relação entre as variáveis ambientais e a variação dos dados multivariados.

A separação em razão da aplicação da maior dose de N nas primeiras coletas, não observada nas coletas posteriores, sugere que as doses de N aplicadas ao solo tenham afetado a estrutura das comunidades bacterianas logo após a sua introdução no ambiente, e após esse distúrbio inicial, as comunidades bacterianas tenham sido reestruturadas. Essa hipótese é plausível, pois seis meses após a adubação com N, época das primeiras coletas, foi possível observar alteração na estrutura da comunidade de bactérias no tratamento com maior dose de N aplicado ao solo, o que não foi observado após um ano, ocasião das segundas coletas. Ou seja, com o passar do tempo, o grau de interferência causada pela adição de N na estrutura das comunidades pode ter diminuído.

Após um estresse ou distúrbio, o agroecossistema pode sofrer um decréscimo em suas características físicas, químicas e biológicas e depois retornar para o nível anterior (LOPES, 2001). O tempo necessário para o ecossistema retornar ao seu estado inicial, após um distúrbio qualquer, define a resiliência do sistema, ou seja, quanto maior esse tempo, menor a resiliência. A diminuição da diversidade microbiana pode levar a perda de resiliência e, por conseqüência, da qualidade do solo (ZILLI et al., 2003). Jackson et al. (2003),

estudando o efeito do revolvimento do solo em sistema convencional de cultivo sob a estrutura e atividade das comunidades microbianas do solo, em comparação com o sistema de plantio direto, no qual não há manejo mecânico do solo, constataram mudanças imediatas na estrutura das comunidades microbianas do solo após o manejo, porém essa mudança foi temporária. Outros autores (PETERSEN; KLUG, 1994; REICOSKY; DUGAS; TORBERT, 1997; ROCHETTE; ANGERS, 1999) também notaram alterações temporárias na estrutura das comunidades microbianas do solo após ocorrência de estresse ou distúrbio.

2.4.2.6 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de amônio (AOB)

Por ser um elemento indispensável para os seres vivos, e conseqüentemente um fator limitante do crescimento dos vegetais, o N tornou-se um dos principais adubos utilizados na agricultura. Como a nitrificação é o processo aeróbico central no ciclo do N, o conhecimento da diversidade dos organismos envolvidos nessa transformação pode auxiliar no controle da mesma, possibilitando o manejo adequado da microbiota para o aumento da produtividade das culturas, com menores perdas de NO_3^- . A nitritação é a primeira e mais limitante etapa do processo de nitrificação (PROSSER; EMBLEY, 2002), e as AOB desempenham papel essencial nesse processo, na qual os íons amônio (NH_4^+) são oxidados a nitrito (NO_2^-).

Visando determinar os efeitos da adubação nitrogenada na diversidade genética das AOB presentes no solo, foi feito o seqüenciamento parcial dos genes rRNA 16S amplificados por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos. Para essas determinações foram selecionadas amostras de terra da camada 0-10 cm, na linha de plantio, do tratamento com aplicação de 80 kg de N ha^{-1} e da testemunha sem adição de N, nas primeiras coletas, nas duas áreas experimentais. O tratamento com adição de 80 kg de N ha^{-1} no plantio foi utilizado por ser a dose comumente utilizada e que mostrou ter a estrutura da comunidade bacteriana alterada em relação ao controle e à menor dose de N na análise por PCR-DGGE.

A amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S do grupo de AOB gerou um fragmento de 465 pares de bases (pb). Essas seqüências foram agrupadas em unidades

taxonômicas operacionais (UTOs) e comparadas com seqüências de bancos de dados públicos, para identificar seqüências mais similares e determinar os índices de diversidade. Na Tabela 10 são apresentadas as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura de amostragem. A distância evolutiva (D) escolhida para definição das UTOs neste trabalho foi de 0,03.

Tabela 10 – Estimativas de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas do gene rRNA 16S de AOB em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, com aplicação de 80 kg de N ha⁻¹ (80) no plantio e sem aplicação de N (0) na USL e USA

Comunidade	Estimativa de Riqueza de UTOs				Índices de Diversidade		
	NS	NU	ACE	Chao1	Shannon ^a	1/D ^b	ECA
D=0,03							
USL							
0	65	24	62.0 (36.4;140.1)	88.0 (38.6;304.5)	2.57 (2.3;2.8)	7.5 (4.9;15.9)	0.75
80	81	34	155.1 (74.7;394.2)	118.5 (60.6;302.4)	2.85 (2.6;3.1)	9.8 (7.2;15.3)	0.68
D=0,03							
USA							
0	89	19	40.9 (25.2 ; 96.3)	91.0 (30.8; 459.2)	1.74 (1.4;2.1)	2.7 (1.7;6.1)	0.87
80	76	20	67.2 (33.0 ;191.7)	111.0 (52.9; 271.5)	2.24 (2.0;2.5)	5.9 (3.8;13.1)	0.81

^a Estimador de máxima semelhança, ^b Estimador de máxima semelhança, 1/D recíproca do índice de Simpson. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

As estimativas de riqueza de UTOs, através dos métodos não-paramétricos ACE e Chao1, e os índices de diversidade de Shannon e recíproca de Simpson, mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos sem aplicação de N no solo e com aplicação 80 kg de N ha⁻¹.

Apesar de não ter diferença significativa na estimativa de riqueza e índice de diversidade entre os tratamentos, a comparação estatística das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S, utilizando o S-LIBSHUFF, mostrou que as comunidades de AOB no solo da USA com adição de 80 kg de N ha⁻¹ e sem aplicação do adubo diferem estatisticamente ($p < 0,01$) entre si (Tabela 11), enquanto que na USL essas comunidades não diferem estatisticamente.

Tabela 11 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S das comunidades de AOB de amostras de solo sob cultivo de cana-de-açúcar, com aplicação de 80 kg de N ha⁻¹ (80) no plantio e sem aplicação de N (0) na USL e USA

X	Y			
	USL		USA	
	0	80	0	80
0	-	0,4229	-	0,0000
80	0,7795	-	0,7842	-

X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,005 e 0,0253 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

Avrahami e Bohannan (2006) notaram diminuição na abundância de *Nitrosospira* sp. com a adição de adubo à base de uréia, em solo de floresta incubado a diferentes temperaturas. Em contraste, Hermansson e Lindgren (2001) utilizando PCR em tempo real observaram uma abundância de AOB em solos agrícolas com e sem adição de adubos nitrogenados três vezes maior do que no solo sem adubação. Esses dados sugerem que a abundância e diversidade de AOB pode depender da dose do adubo nitrogenado e/ou do manejo do solo.

A alteração da estrutura da comunidade de AOB no solo da USA ocorreu devido a alteração no aumento da frequência da UTO 5 e redução da frequência da UTO 1 no solo que recebeu adubação nitrogenada, principalmente. Além disso 11 UTOs só foram detectadas no tratamento com adubação e 10 no tratamento sem adubação.

Essa alteração sofrida pela comunidade de AOB com aplicação de 80 kg de N ha⁻¹ ao solo no plantio da cana-de-açúcar na USA, pode explicar parcialmente as alterações na estrutura da comunidade de bactérias do solo observadas por PCR-DGGE (Figura 21). Alterações significativas na estrutura das comunidades de AOB observadas apenas na USA sugerem que o tipo de solo pode ser um fator mais importante do que o manejo na estruturação das comunidades de AOB.

As relações filogenéticas entre as UTOs detectadas no solo da USA e USA, sob diferentes tratamentos pode ser vista nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

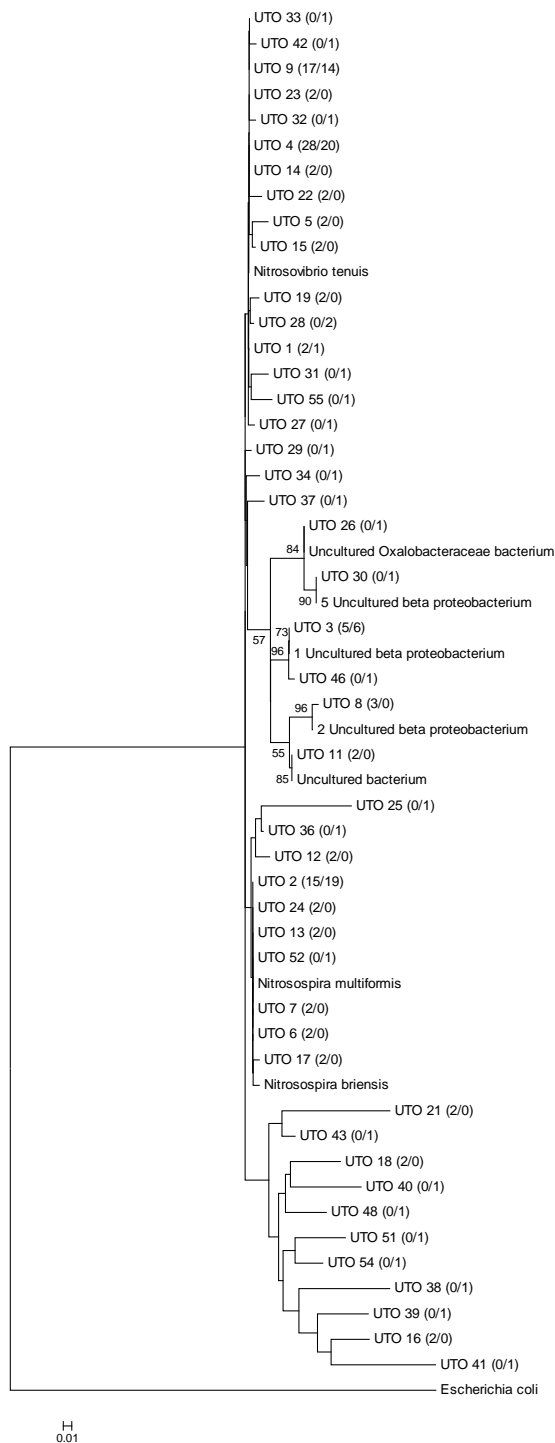


Figura 23 – Sequências do gene rRNA 16S de AOB, encontradas em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, com (80 kg de N ha⁻¹) e sem aplicação de N, na USL. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap maior do que 50 (500 replicações). Os números em parênteses indicam a frequência (em %) de UTOs nas bibliotecas de amostras de solo sem N e com 80 kg de N ha⁻¹, respectivamente

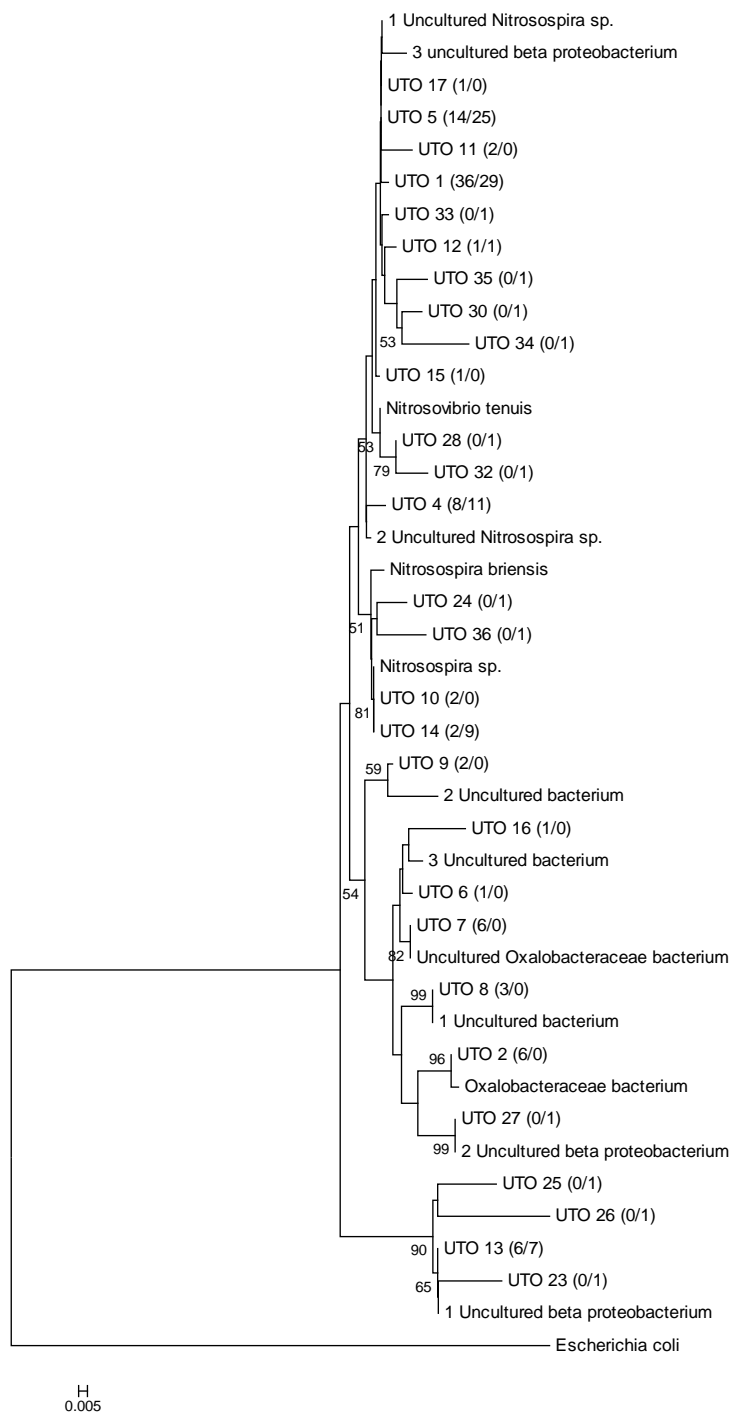


Figura 24 – Sequências do gene rRNA 16S de AOB, encontradas em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, com (80 kg de N ha⁻¹) e sem aplicação de N, na USA. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap maior do que 50 (500 replicações). Os números em parênteses indicam a frequência (em %) de UTOS nas bibliotecas de amostras de solo sem N e com 80 kg de N ha⁻¹, respectivamente

Tanto na USL quanto na USA, foi detectada a presença de UTOs relacionadas à bactérias da família Nitrosomonadaceae, gêneros *Nitrospira* (*Nitrospira multiformis* e *Nitrospira briensis*) e *Nitrosovibrio* (*Nitrosovibrio tenuis*), associadas à oxidação de amônio no solo. Das 143 seqüências obtidas nas duas bibliotecas (sem N e 80 kg de N ha⁻¹), na USL, 62 % estão representadas pelas UTOs 2, 3, 4 e 9 (Figura 23). As UTOs 9 e 4 (39 % do total de seqüências) apresentam similaridade com *Nitrosovibrio tenuis*, a UTO 2 (25 % do total de seqüências) apresenta similaridade com *Nitrospira multiformis* e a UTO 3 (8 % do total de seqüências) apresenta similaridade com uma espécie não-identificada de Betaproteobacteria. Nessas quatro UTOs estão representadas 67 % das seqüências da biblioteca oriunda do tratamento controle sem adição de N e 59 % das seqüências oriundas do tratamento com aplicação de 80 kg de N ha⁻¹.

Na USA, as UTOs 1, 4, 5 e 13 representam 67 % do total de seqüências analisadas (164) (Figura 24), com 64 % e 46 % das seqüências das bibliotecas provenientes das amostras sem e com aplicação de N, respectivamente. Do total de seqüências, 61 % estão representadas pelas UTOs 1, 4 e 5, as quais são filogeneticamente relacionadas ao gênero *Nitrospira*, e 6 % pela UTO 13, filogeneticamente relacionada a uma Betaproteobacteria não-cultivada.

Para verificar a relação filogenética entre os clones identificados nas duas áreas estudadas (Figura 25) foram selecionadas as UTOs com maior abundância na USL (UTOs 2, 3, 4 e 9) e USA (UTOs 1, 4, 5 e 13).

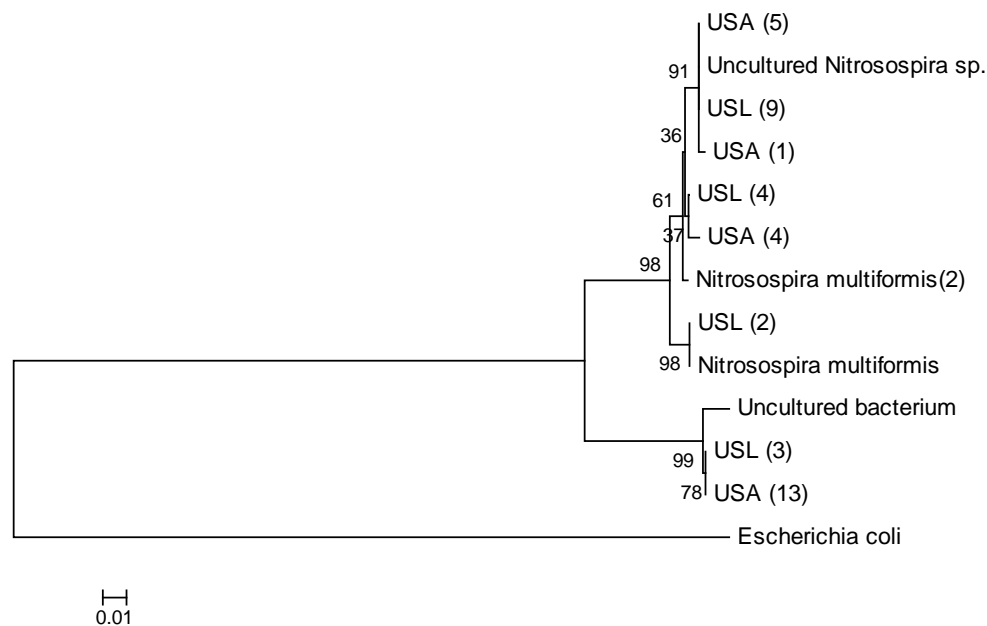


Figura 25 – Sequências do gene rRNA 16S de AOB, das UTOs mais abundantes encontradas na Usina São Luiz (USL) e Santa Adélia (USA) em solo sob cultivo de cana-de-açúcar, com (80 kg de N ha⁻¹) e sem aplicação de N. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap maior do que 50 (500 replicações). Os números em parênteses indicam a UTOs que representa cada área experimental

Os dados mostraram que 75 % das OTUS selecionadas, são filogeneticamente relacionadas a *Nitrosospira multififormes*. Como foram utilizadas para essa análise as OTUs que ocorrem em maior abundância nas áreas estudadas, conclui-se que nas duas áreas predominam *Nitrosospira multififormes*.

Assim como em experimento realizado por Cenciani (2007), avaliando o impacto no uso da terra (floresta, pastagem e capoeira) sobre a comunidade de AOB, foram detectadas seqüências de betaproteobactérias não diretamente relacionadas ao grupo das AOB, pertencentes à ordem Burkholderiales (família Oxalobacteraceae) nas duas áreas de estudo. Esses dados sugerem que os *primers* CTO podem apresentar baixa especificidade em relação à família Nitrosomonadaceae.

3 CONCLUSÕES

3.1 Experimento 1

A mudança no manejo de colheita da cana-de-açúcar pode provocar modificações no metabolismo heterotrófico do solo, alterando a capacidade e a diversidade metabólica.

Não houve mudanças na estrutura das comunidades bacterianas do solo com e sem queima sob a variedade SP801842. Dessa forma, a primeira queima da cana-de-açúcar previamente à colheita alterou a capacidade e a diversidade metabólica microbiana, mas não mudou a estrutura das comunidades de bactérias em relação à área sem queima.

3.2 Experimento 2

As doses de N alteraram a estrutura das comunidades bacterianas do solo nas duas áreas experimentais, determinadas por PCR-DGGE.

A adubação nitrogenada realizada no plantio da cana-de-açúcar não alterou a diversidade de AOB no solo da USA e USL.

A estrutura da comunidade de AOB no solo da USA, sem adubação nitrogenada e com 80 kg de N ha⁻¹ diferiu estatisticamente.

Nas duas áreas as OTUs mais abundantes se relacionam filogeneticamente a AOB *Nitrospira multifomes*.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO FILHO, J.; MATSUOKA, S.; SPERANDIO, M.L.; RODRIGUES, R.C.D.; MARCHETTI, L.L. Resíduo da colheita mecanizada de cana crua. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, n.67, p.23-25, abril/maio 1993.
- ALLTON, K.E. **Interactions between soil microbial communities, erodibility and tillage practices**. 2006. 224 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - School of Applied Sciences, Cranfield University, London, 2006.
- AMANN, R.I. ; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 555-565, 2000.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDERSON, J.P.E. ; DOMSCH, K.H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil Science**, New Brunswick, v.130, p.211-216, 1980.
- ANDERSSON, M.; MICHELSEN, A.; JENSEN, M.; KJOLLER, A. Tropical savannah woodland: effects of experimental fire on soil microorganisms and soil emissions of carbon dioxide. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 849-858, 2004.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de rizóbio e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M. ; ARAUJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 63-94.
- ANGERS, D.A.; BISSONNETTE, N; LEGERE, A; SAMSON, N. Microbial and biochemical changer induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Canadian Journal of Soil Science**, Ontario, v. 73, p. 39-50, 1993.
- AVRAHAMI, S.; BOHANNAN, B.J.A. Response of *Nitrosospira* sp. strain AF-like ammonia oxidizers to changes in temperature, soil moisture content, and fertilizer concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 73, p. 1166–1173, 2007.
- AVRAHAMI, S.; CONRAD, R.; BRAKER, G. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 68, p. 5685 - 5692, 2002.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; LIMA, E.; FERNANDES, M.S.; VIEIRA, J.R. Parcelamento da adubação nitrogenada em cana-planta no norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 18, n. 3, p. 441-447, 1994.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J.R. Nitrogênio em cana-planta – doses e fracionamento. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 6,

n. 5, p. 26-33, 1986.

BALL-COELHO, B.R.; ROY, R.C.; BRUIN, A.J. Nitrate leaching as affected by liquid swine manure and cover cropping in sandy soil of southwestern Ontario. **Canadian Journal of Soil Science**, Ontario, v. 84, n. 2, p. 187-197, 2004.

BARETTA, C.R.D.M. **Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia***. 2007. 185 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BENDING, G.D.; PUTLAND, C.; RAYNS, F. Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 31, p. 78–84, 2000.

BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 18, p. 574-581, 1995.

BONDE T.A.; ROSSWALL T.; VICTORIA R.L. The dynamics of soil organic matter and soil microbial biomass following clear felling and cropping of a tropical rainforest soil in the central Amazon. In: BONDE, T.A. (Ed). **Size and Dynamics of Active Soil Organic Matter Fraction as Influenced by Soil Management. Linkoping Studies in Arts and Science**. Linkoping: Sweden, 1991. 63p.

BROOKES, P.C.; JOERGENSEN, R.G. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1023-1027, 1990.

BUNEMANN, E.K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 44, p. 379-406, 2006.

CAMPOS, D.C. de. **Potencialidade do sistema de colheita sem queima da cana-de-açúcar para o seqüestro de carbono**. 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CANÇADO, J.E.D.; SALDIVA, P.H.N.; PEREIRA, L.A.A.; LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; ARBEX, M.A.; ZANOBETTI, A.; BRAGA, A.L.F. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.114, n.5, p.725-729, 2006.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van. Adubação nitrogenada no Estado de São Paulo. In: SANTA, M.B.M. (Ed.). **Adubação nitrogenada no Brasil**. Ilhéus: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1985. p. 47-49.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2007, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: IPNI, 2007. p. 355-392.

CARNAÚBA, B.A.A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 8, n. 3/4, p. 24-41, 1990.

CARNEY, K. M.; MATSON, P. A.; BOHANNAN, B. J.M. Diversity and composition of tropical soil nitrifiers across a plant diversity gradient and among land-use types. **Ecology Letters**, New York, v. 7, p. 684-694, 2004.

CARTER, M.R. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 7, p. 29-40, 1986.

CATTELAN, A.J. ;VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 14, p. 133-142, 1990.

CENCIANI, K. **Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação**. 2007. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CHAO, A.; CHEN, T.C. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

CHOI, K.; DOBBS, F.C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, p. 203-213, 1999.

CLASSEN, A.T.; BOYLE, S.I.; HASKINS, K.E.; OVERBY, S.T.; HART, S.C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.44, p. 319-328, 2003.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 35. 169-172. 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/cana.pdf>>. Acesso em: 18 de Jun. 2008.

COOKSON, W.R.; OSMAN, M.; MARSCHNER, P.; ABAYE, D.A.; CLARK, I.; MURPHY, D.V.; STOCKDALE, E.A.; WATSON, C.A. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 744-756, 2007.

COSER, T.R. **Doses de nitrogênio e seu efeito nos indicadores microbiológicos de qualidade do solo na cultura da cevada**. 2006. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

COUTINHO, H.L.C. **Avaliação da Biodiversidade do Solo através de Exame de DNA**. Disponível em: <<http://www.cnps.embrapa.br/search/pesqs/tema2/tema2.html#13>>. Acesso em: 20 de Abril 2005.

DE BOER, W.; KOWALCHUK, G.A. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 853-866, 2001.

DEGRANGE, V.; BARDIN, R. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 61, p. 2093-2098, 1995.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 10 p., 1997.

DUMONTET, S.; DINEL, H.; SCOPA, A.; MAZZATURA, A.; SARACINO, A. Post-fire soil microbial biomass and nutrient content of a pine forest soil from a dunal Mediterranean environment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1467–1475, 1996.

DUNFIELD, K.E. & GERMIDA, J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2001.

ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 133-154, 1998.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Adubos**. SILVA, F. C. da (coord.) Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 370 p.

Enwall, K.; Nyberg, K.; Bertilsson, S.; Cederlund, H.; Stenström, J.; Hallin, S. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 106–115, 2007.

ERNANI, P.R.; SANGOI, L.; LECH, V.A.; RAMPAZZO, C. A forma de aplicação da uréia e dos resíduos vegetais afeta a disponibilidade de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.360-365, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**. Woodbury. v. 8. p. 186-194. 1998.

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

FELSENSTEIN, J. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Acesso em: 10 Sept. 2007.

FIGUEIREDO, C.C.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C.; FERREIRA, E.A.B.; RAMOS, M.L.G. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em resposta a diferentes sistemas de manejo em um latossolo vermelho no cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 31, p. 551-562, 2007.

FRANCO, H.C.J. **Eficiência agrônômica da adubação nitrogenada da cana-planta**. 2008. 128 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FREY, S.D.; KNORR, M.; PARRENT, J.L.; SIMPSON, R.T. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. **Forest Ecology and Management**. Amsterdam, v. 196, p. 159–171, 2004.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243–270, 2004.

GARCIA, F.O.; RICE, C.W. Microbial biomass dynamics in tall-grass prairie. **Soil Science Society of America Journal**. Madison, v. 58, p. 816-823, 1994.

GARLAND, J.L. Patterns of potencial C source utilization by rhizospher communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 223-230, 1996.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns on community-level, sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A ROAD MAP TO THE MANUAL. IN: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M. **Bergey’s manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Berlin: Springer. 2001. 721 p.

GEETS, J.; COOMAN, M.; WITTEBOLLE, L.; HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; DE VOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 75, p. 211–221, 2007.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 155-164, 2005.

HARMS, G.; LAYTON, A.C.; DIONISI, H.; GREGORY, I.; GARRETT, V.; HAWKINS, S.; ROBINSON, K.; SAYLERM, A. Real-Time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 37, p. 343-351, 2003.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P.E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 67, p. 972–976, 2001.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

IBEKWE, A.M.; KENNEDY, A.C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 151-163, 1998.

INSAM, H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: INSAM, H.; RANGGER, A. (Ed.) **Microbial Communities**. Berlin: Springer, 1997, p. 259-260.

INTERGIVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change in 1994: radioactive forcing of climate change**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 339p.

JACKSON, C.R.; RODEN, E.E. & CHURCHILL, P.F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.1, p.49-51, 2000.

JACKSON, L.E.; CALDERON, F. J.; STEENWERTH, K. L.; SCOW, K. M.; ROLSTON, D. E. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 305-317, 2003.

JUKKA KUROLA, J.; SALKINOJA-SALONEN, M.; AARNIO, T.; HULTMAN, J.; ROMANTSCHUK, M. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 250, p. 33–38, 2005.

KARLEN, D. L.; DITZLER, C. A.; ANDREWS, S. S. Soil quality: why and how? **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 145-156, 2003.

- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystem. **Agriculture Ecosystem and Environmental**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.
- KORNDÖRFER, G.H.; VALLE, M.R.; MARTINS, M.; TRIVEIN, P.C.O. Aproveitamento do nitrogênio da uréia pela cana-planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, n. 1, p. 23-26, 1997.
- KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; DE BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. Analysis of β -proteobacteria ammonia-oxidizing bacteria in coastal sand dunes using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, p.1489 - 1497, 1997.
- KOZDRÓJ, J.; Van ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 3 , p. 197-212, 2001.
- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2005. v. 4, p. 43-84,.
- LÓPEZ-GARCÍA, P.; MOREIRA, D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. **Research in Microbiology**, New York, v.159, p.67-73, 2008.
- LUPWAYI, N.Z.; ARSHAD, M.A.; RICE, W.A.; CLAYTON, G.W. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 16, p. 251-261, 2001.
- MALONEY, P.E.; van BRUGGEN, A.H.C. & HU, S. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. **Microbial ecology**. New York, v. 34, p. 109–117, 1997.
- MATSUOKA, M.; MENDES, I.C. ; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 425-433, 2003.
- MENGEL, K. Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. **Plant and Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 83-93, 1996.
- MORAIS, M. **Biomassa microbiana, atividade enzimática e formas de nitrogênio em sistemas de manejo para produção de milho**. 2004. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2^a ed., 729 p., 2006.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, n. 127–141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 59, p. 695-700, 1993.

NDAW, S.M. **Atividade e funcionalidade das comunidades nitrificadoras, desnitrificadoras e fixadoras de nitrogênio em solos sob diferentes coberturas vegetais na região norte do estado do Rio de Janeiro**. 2007. 152 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Campos dos Goytacazes, 2007.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

O’DONNELL, A.G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, W.; DAVIES, J.T. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, p. 135–145, 2001.

OKANO, Y.; HRISTOVA, K.R.; LEUTENEGGER, C.M.; JACKSON, L.E.; DENISON, R.F.; GEBREYESUS, B.; LEBAUER, D.; SCOW, K.M. Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 70, p. 1008–1016, 2004.

OLIVEIRA, M.W.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C.; PENATTI, C.P. Degradação da palhada de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 803-809, 1999.

ORLANDO FILHO, J. Calagem e adubação da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.S.; OLIVEIRA, E.A.A. (Ed.). **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993.

OTTO, R. **Desenvolvimento de raízes e produtividade de cana-de-açúcar relacionados à adubação nitrogenada**. 2007. 117 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ØVREÅS, L. & TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 303–315, 1998.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORVISK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 9, p. 3367 - 3373, 1997.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.9, p.1-55, 1986.

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

PEREZ, K.S.S.; RAMOS, M.L.G.; MCMANUS, C. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 40, n. 2, p. 137-144, 2005.

PETERSEN, S.O.; KLUG, M.J. Effects of tillage, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 60, p. 2421–2430, 1994.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C. ; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of change in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.159-164, 1987.

PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M. Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. **Antonie van Leeuwenhoek. Wageningen**, . Wageningen, v. 81, p. 165–179, 2002.

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

REBER, H.H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.13, p. 181-186, 1992.

REICOSKY, D.C.; DUGAS, W.A.; TORBERT, H.A. Tillage-induced soil carbon dioxide loss from different cropping systems. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 41, p.105–118, 1997.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio – estado da arte. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Ed). **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 151-180, 2005.

RESENDE, A.S; XAVIER, R.P.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. ; BODDEY, R.M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and soil**, The Hague, v. 281, p. 339-351, 2006.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.A. Soil surface carbon dioxide fluxes induced by spring, summer, and fall mouldboard plowing in a sandy loam. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 63, p. 621–628, 1999.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMEIRE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, New York, v.1, p.283-290, 2007.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S. **Recursos genéticos e melhoramento**. Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, p.97-128, 2002.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.135-147, 1997.

RUPPEL, S.; TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; ØVREÅS, L.; RÜHLMANN, J. Nitrogen availability decreases prokaryotic diversity in sandy soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.43, p.449–459, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS: user's guide: estatistics**. 6th ed. Cary, 2002.

SCHLOSS. P.D.; HANDELSMAN. J. Introducing to DOTUR. a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 71. p. 1501-1506. 2005.

SINGLETON. D.R.; FURLONG. M.A.; RATHBUN. S.L.; WHITMAN. W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 67. p. 4374-4376. 2001.

SMALLA, K.; WACHTENDORF, U.; HEUER, H.; LIU, W-T; FORNEY, L. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.64, n.4, p. 1220–1225, 1998.

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

STOCKDALE, E.A.; BROOKES, P.C. Detection and quantification of the soil microbial biomass – impacts on the management of agricultural soils. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 144, n. 4, p. 285-302, 2006.

STRENSTRÖM, J.; SVENSSON, K.; JOHANSSON, M. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 2/3, p. 93-104, 2001.

SZMRECSÁNYI, T. Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.10, p.73-81, 1994.

- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.64, p.53-62, 1998.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.56, p.778-787, 1990.
- TRIVELIN, P.C.O.; RODRIGUES, J.C.S.; VICTORIA, R.L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-¹⁵N e uréia-¹⁵N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.31, n.2, p.89-99, 1996.
- TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; RODRIGUES, J.C.S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-¹⁵N e uréia-¹⁵N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.12, p.1375-1385, 1995.
- TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C.; SARRIÉS, G.A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 637-646, 2002.
- TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS, p. 529-549, 1999.
- URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; LIMA, E.; GUIMARÃES, D.H.V. **Importância de não queimar a palha da cana-de-açúcar**. Brasília: EMBRAPA, 1991. 12 p. (Comunicado Técnico, 5).
- VALLAEYS, T.; TOPP, E; MUYZER, G; MACHERET, V; LAGUERRE, G; SOULAS, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, , Amsterdam, v. 24, p. 279–285, 1997.
- VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 133–154, 1998.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measurement soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.
- VARGAS, L.K. ; SCHOLLES, D. Nitrogênio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, p. 411-417, 1998.

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

VENTEREA, R. T.; GROFFMAN, P. M.; VERCHOT, L. V.; MAGILL, A. H.; ABER, J. D. Gross nitrogen process rates in temperate forest soils exhibiting symptoms of nitrogen saturation. **Forest Ecology and Management**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 129 - 142, 2004.

WARD, D. M. A natural species concept for prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**. Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 271-277, 1998.

WITHMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.6578-6583, 1998.

WOOD, A.W. Management of crop residues following green harvesting of sugarcane in north Queensland. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v.20, p.69-85, 1991.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1101-1108, 1994.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

LOPES, E.B.M. Diversidade metabólica em solo tratado com biossólidos. 2001. 77 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)