

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE  
*Campus* SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

CAROLINE SAYURI NISHISAKA

**IMPACTOS DA MUDANÇA DO USO E COBERTURA DO SOLO NA EMISSÃO DE  
ÓXIDO NITROSO E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES NO  
SOLO**

Sorocaba  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE  
*Campus* SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

CAROLINE SAYURI NISHISAKA

**IMPACTOS DA MUDANÇA DO USO E COBERTURA DO SOLO NA EMISSÃO DE  
ÓXIDO NITROSO E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES NO  
SOLO**

Defesa apresentada ao Centro de Ciências para a Sustentabilidade (CCTS) da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA).

**Orientação:** Dr. Acacio Aparecido Navarrete

**Co-orientação:** Profa. Dra. Janaina Braga do Carmo

Sorocaba  
2018

Nishisaka, Caroline Sayuri

Impactos da mudança do uso e cobertura do solo na emissão de óxido nitroso e abundância de bactérias desnitrificantes no solo / Caroline Sayuri Nishisaka. -- 2018.

57 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Acacio Aparecido Navarrete

Banca examinadora: Maurício Roberto Cherubin, Danielle Gregorio Gomes Caldas

Bibliografia

1. Desnitrificação. 2. Gases do efeito estufa. 3. Microiota do solo. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

**CAROLINE SAYURI NISHISAKA**

**IMPACTOS DA MUDANÇA DO USO E COBERTURA DO SOLO NA EMISSÃO DE  
ÓXIDO NITROSO E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES NO  
SOLO**

Defesa apresentada ao Centro de Ciências para a Sustentabilidade (CCTS) da Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA).

Sorocaba, 03 de Maio de 2018

Orientador

---

Dr. Acacio Aparecido Navarrete  
Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba

Co-orientadora

---

Profa. Dra. Janaina Braga do Carmo  
Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba

Examinador

---

Prof. Dr. Maurício Roberto Cherubin  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP, *Campus* Piracicaba

Examinadora

---

Dra. Danielle Gregorio Gomes Caldas  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, *Campus* Piracicaba

Sorocaba  
2018

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esse trabalho a toda minha família e amigos, que estiveram ao meu lado durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por tudo!*

## AGRADECIMENTO

*Agradeço a todos envolvidos em meu trabalho, em especial a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo apoio (FAPESP 2016/15289-4, FAPESP-BEPE 2017/17441-0) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas.*

*Ao Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete, pela excelente orientação e companheirismo. Obrigada pela confiança, dedicação e conhecimento passado.*

*À Prof. Dra. Janaina Braga do Carmo, pela co-orientação e infraestrutura.*

*Aos proprietários José Luis Moreira César e Pedro Conde Filho, por cederem suas propriedades para a pesquisa.*

*À supervisora de pesquisa no exterior, Laura Meredith, por todo conhecimento e apoio. Não poderia esquecer de Vanessa e Connor, que me auxiliaram com as análises no software R, obrigada.*

*Aos técnicos Leonardo Machado Pitombo e Isadora Leme, por todo auxílio intelectual e técnico. Aos meus colegas de campo e bancada, Andrea, Camila, Danilo, Dayane, Letícia, Marília e Carolina Brandani pela amizade e apoio.*

*Agradeço também a minha amiga Gabriela Ramos, que disponibilizou seu tempo e me acompanhou em coletas, obrigada. Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e aconselharam em momentos difíceis.*

*Aos meus pais, por me ouvirem e apoiarem, e ao meu irmão por também ceder parte de seu tempo para me acompanhar em coletas, obrigada.*

*E, por fim, a todos aqueles que em meio a minha jornada cederam parte de seu tempo para me ensinar e apoiar, obrigada a todos.*

## RESUMO

NISHISAKA, C.S. Impactos da mudança do uso e cobertura do solo na emissão de óxido nitroso e abundância de bactérias desnitrificantes no solo. 2018. 53 f. Exame de Defesa de Mestrado (Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, 2018,

A agricultura é responsável por 80 % do óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) emitido para a atmosfera terrestre, o qual é considerado, dentre os principais gases causadores do efeito estufa, aquele com maior potencial de aquecimento global. A citricultura e a silvicultura são culturas agrícolas que apresentam importante papel na economia brasileira, devido a alta demanda de exportação de produtos derivados da laranja e da madeira. A fim de entender como essas culturas influenciam na emissão do N<sub>2</sub>O, esse trabalho teve como objetivo avaliar as emissões de N<sub>2</sub>O a partir de solos cultivados com *Citrus sinensis* e *Eucalyptus* spp. Solos florestais adjacentes às áreas agrícolas foram utilizados como controle. As áreas cultivadas com citros e eucalipto estão localizadas nos municípios de Sorocaba e Salto de Pirapora, respectivamente, ambos no estado de São Paulo, Brasil. Em cada área agrícola e florestal, oito câmaras estáticas foram aleatoriamente instaladas e amostras de gases foram coletadas durante o período seco e úmido. Amostras de solo foram coletadas em cada área de estudo a partir de cinco pontos amostrais, as quais foram submetidas a análises físico-químicas, moleculares e incubação em microcosmo. Amostras de gases também foram coletadas a partir dos ensaios de incubação do solo em microcosmos após ajuste da umidade em 70 % da capacidade de campo. Todas as amostras de gases foram analisadas pela técnica de cromatografia gasosa. O número de cópias de genes relacionados com o processo de desnitrificação (*nirK*, *nirS* e *nosZ*) foi determinado por PCR quantitativo em tempo real. A sazonalidade mostrou efeito significativo ( $P < 0,05$ ) nas emissões de N<sub>2</sub>O em campo, e nos fluxos de N<sub>2</sub>O determinados a partir do solo incubado. Foi mostrada correlação positiva entre a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) no solo, o teor de carbono e nitrogênio total em solos e resíduos vegetais e as emissões de N<sub>2</sub>O. Maior abundância dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* foi encontrada nas amostras de solo coletadas no período úmido em comparação com aquelas coletadas no período seco, tanto em campo como em microcosmo, a qual foi correlacionada com a concentração de COD e a umidade do solo. Contudo, não houve diferença significativa na abundância de tais genes quando comparadas amostras de solos cultivados e florestais adjacentes. Tomados conjuntamente, os resultados permitiram concluir que a sazonalidade influencia tanto a emissão de N<sub>2</sub>O quanto a abundância de bactérias desnitrificantes presentes em solos cultivados com citros e eucalipto, mediante, principalmente, os efeitos nas características físicas e químicas do solo e dos resíduos vegetais, especialmente aqueles relacionados com o COD e umidade do solo.

Palavras-chave: Desnitrificação. Gases do efeito estufa. Microbiota do solo. Eucalipto. *Citrus*.

## ABSTRACT

NISHISAKA, C.S. Impacts of land change use and plant residue on nitrous oxide emission and denitrifying bacteria abundance on soil. 2018. 53p. Dissertation defense exam (Program in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Federal University of Sao Carlos, *campus* Sorocaba, 2018.

Agriculture is responsible for 80% of nitrous oxide emissions on earth's atmosphere, the most potential greenhouse gas among the three main gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O). Citriculture and silviculture play an important role on Brazilian economics due to the high demand of orange and wood products for exportation. Thus, in order to get a better understand about the role of those cultures on N<sub>2</sub>O emission, this research aims to evaluate N<sub>2</sub>O emissions from *Citrus sinensis* and *Eucalyptus* spp. crops, adjacent forests of each agriculture field were used as control. Citrus and eucalyptus sites are located in Sorocaba and Salto de Pirapora municipality, both in the state of Sao Paulo, Brazil. In each agriculture field and adjacent forest, eight static chambers were randomly installed, and gas sample were collected during dry and wet region season. Soil samples were collected in each field of study from five random sampling points, for further physicochemical, molecular analysis and microcosm incubation. Gas samples were collected from microcosm after moisture adjustment in 70% of field capacity. All gas samples were analyzed by gas chromatography technique. The number of copies of genes related to denitrifying process (*nirK*, *nirS* e *nosZ*) was determined by quantitative real time PCR. Seasonality had significant ( $P < 0.05$ ) influence on N<sub>2</sub>O emission in field, and N<sub>2</sub>O fluxes in incubated soil. It was observed positive correlation among dissolved organic carbon (DOC) concentration on soil, soil and plant residue total carbon and nitrogen content and N<sub>2</sub>O emissions. High *nirK*, *nirS* and *nosZ* gene abundance was found on soil collected during wet season, comparing to those collected on dry season, in both field and microcosm, which was correlated with DOC content and soil moisture. However, there were not significant differences on genes abundance comparisons between cultivated soils and adjacent forests. In conclusion, the seasonality has influence in both N<sub>2</sub>O emission and denitrifying bacteria abundance present in citrus- and eucalyptus-cultivated soils, mainly through the effects on soil and plant residue physicochemical characteristics, especially those related to COD and soil moisture.

Keywords: Denitrification. Greenhouse gas. Soil microbiome. Eucalyptus. *Citrus*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio em ambiente terrestre, NOP = Nitrogênio orgânico particulado; NOD = Nitrogênio orgânico dissolvido; RDNA = Redução dissimiltória do nitrato a amônia, seta = as formas gasosas do nitrogênio ..... 16
- Figura 2. Etapa da desnitrificação contendo os principais genes codificadores das enzimas correspondentes a etapa (Adaptado de ALVAREZ et al., 2014) ..... 20
- Figura 3. Áreas de amostragem localizadas no sudeste do Brasil. O pomar de citros e a floresta a ele adjacente, Floresta 1, estão localizados no município de Sorocaba (23° 34' 35,76" S; 47° 30' 58,95" O e 23° 34' 14,21" S; 47° 30' 50,23" O, respectivamente); e o plantio de eucalipto e o fragmento florestal a ele adjacente, Floresta 2, estão localizados no município de Salto de Pirapora (23° 36' 07,92" S; 47° 33' 42,72" O e 23° 35' 54,13" S; 47° 33' 58,56" O, respectivamente) ..... 26
- Figura 4. Áreas de estudo utilizadas para coleta de amostras de gases e solo. (A) 'Floresta 1', adjacente ao pomar de citros; (B) Pomar de citros; (C) 'Floresta 2', adjacente ao plantio de eucalipto; e (D) Plantio de eucalipto ..... 27
- Figura 5. Esquema representativo da disposição espacial das câmaras estáticas utilizadas para a coleta de gases em campo, sendo estas numeradas de 1 a 8. O espaçamento entre as câmaras na horizontal foi de aproximadamente 3 metros; e o espaçamento na vertical variou de 6 a 7 metros, dependendo da área de estudo ..... 28
- Figura 6. Câmara estática utilizada para coleta de gás. A imagem mostra uma câmara tampada, com seringa de coleta acoplada, frascos de amostragem, termômetro e cronômetro ..... 28
- Figura 7. Coleta de amostras de solo para análises físicas, químicas e moleculares/microbiológicas. (A) Local de amostragem antes da coleta de solo; (B) Amostragem da serapilheira e coleta de solo para análises moleculares; (C) As amostras de solo para análises físicas e químicas também foram coletadas de 0 - 10 cm profundidade, assim como as amostras para experimento em microcosmos; (D) Coleta de amostras de solo para análise de nitrato e amônio ..... 30
- Figura 8. Imagem de um subconjunto de frascos utilizados em experimento em microcosmo. (A) Frascos utilizados para a incubação dos solos, com cinco repetições para cada área. (B) Frascos fechados para coleta ..... 34

Figura 9. Emissão acumulada semanal em solos sob citros, eucalipto e vegetação florestal adjacente às áreas de cultivo em período seco e úmido. Teste de Tukey foi feito para comparar os períodos seco e úmido dentro de uma mesma área (letras minúsculas) e Agricultura vs. Floresta adjacente para um mesmo período sazonal (letras maiúsculas) .....	39
Figura 10. Análise de componente principal (ACP) dos fluxos de N <sub>2</sub> O de campo, fatores químicos e físicos dos solos e número de cópias dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> obtidos a partir das amostras de solo coletadas em campo. (A) ACP de ‘Citros’ e ‘Floresta 1’. C PS: Citros no período seco, C PU: Citros no período úmido; F1 PS: Floresta 1 no período seco; F1 PU: Floresta 1 no período úmido; (B) ACP de ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’. E PS: Eucalipto no período seco, E PU: Eucalipto no período úmido; F2 PS: Floresta 2 no período seco; F2 PU: Floresta 2 no período úmido. COD = Carbono orgânico dissolvido; CTS = Carbono total do solo; CTR = Carbono total do resíduo; DA = Densidade aparente; NTS = Nitrogênio total do solo; NTR = Nitrogênio total do resíduo; UM = Umidade do solo .....	41
Figura 11. Média dos fluxos de óxido nitroso em experimento de microcosmos com solos sob citros, eucalipto e vegetação florestal adjacente às áreas agrícolas em período seco e úmido a umidade de 70 % da CC. Teste de Tukey foi feito para comparar os períodos seco e úmido dentro de uma mesma área (letras minúsculas) e Agricultura vs. Floresta para um mesmo período sazonal (letras maiúsculas) .....	43
Figura 12. Análise de componente principal (ACP) dos fluxos de N <sub>2</sub> O obtidos no experimento de incubação em microcosmos, fatores químicos e físicos dos solos e número de cópias dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> obtidos a partir das amostras de solo incubadas em microcosmos. (A) ACP de ‘Citros’ e ‘Floresta 1’. C PS: Citros no período seco, C PU: Citros no período úmido; F1 PS: Floresta 1 no período seco; F1 PU: Floresta 1 no período úmido; (B) ACP de ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’. E PS: Eucalipto no período seco, E PU: Eucalipto no período úmido; F2 PS: Floresta 2 no período seco; F2 PU: Floresta 2 no período úmido. COD = Carbono orgânico dissolvido; CTS = Carbono total do solo; CTR = Carbono total do resíduo; DA = Densidade aparente; NTS = Nitrogênio total do solo; NTR = Nitrogênio total do resíduo; UM = Umidade do solo .....	44
Figura 13. <i>Heatmap</i> de correlação de Pearson, o qual foi feito para testar as relações entre fluxos de N <sub>2</sub> O, fatores químicos, físicos e moleculares. Dados de campo está representado pelo triângulo inferior e dados de microcosmos estão representados pelo triângulo superior. (A) Dados da área de ‘Citros’, campo e microcosmo; (B) Dados da ‘Floresta 1’, campo e	

microcosmo; (C) Dados da área de ‘Eucalipto’, campo e microcosmo; (D) Dados da ‘Floresta 2’, campo e microcosmo. R = Resíduo vegetal; S = Solo ..... 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial de aquecimento global dos três principais gases do efeito estufa em um horizonte de 100 anos, com valores relativos ao CO <sub>2</sub> .....	21
Tabela 2. Informações sobre os <i>primers</i> que foram utilizados para quantificação do número de cópias de genes funcionais microbianos relacionados com o processo de desnitrificação .....	32
Tabela 3. Fatores químicos dos resíduos vegetais e fatores físico-químicos dos solos das áreas de ‘Citros’, ‘Floresta 1’, ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’ em período seco e úmido .....	38
Tabela 4. Abundância absoluta dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> determinada por PCR Quantitativo em Tempo Real a partir de amostras de solo coletadas em campo e incubadas em microcosmos em período seco e úmido .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ARDRA:** *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

**AFDRA:** *Amplified Functional DNA Restriction Analysis*

**C:** Carbono

**CC:** Capacidade de campo

**CTR:** Carbono total do resíduo

**CTS:** Carbono total do solo

**CFE:** Clorofórmio-fumigação-extração

**CFI:** Clorofórmio-fumigação-incubação

**CH<sub>4</sub>:** Metano

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**COD:** Carbono orgânico dissolvido

**DA:** Densidade aparente

**DGGE:** *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

**N:** Nitrogênio

**NTR:** Nitrogênio total do resíduo

**NTS:** Nitrogênio total do solo

**N<sub>2</sub>:** Nitrogênio gasoso

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** Amônio

**NO:** Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Nitrato

**N<sub>2</sub>O:** Óxido nitroso

**NTR:** Nitrogênio total do resíduo

**NTS:** Nitrogênio total do solo

**PCR:** *Polymerase chain reaction*

**qPCR:** *Quantitative Real Time PCR*

**UM:** Umidade do solo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
2.1 MUDANÇAS DO USO DA TERRA E MANEJO AGRÍCOLA DO SOLO .....	19
2.2 MICRO-ORGANISMOS COMO BIOINDICADORES DA MUDANÇA DO USO DO SOLO .....	20
<b>2.2.1 Bactérias, genes e enzimas da desnitrificação</b> .....	22
2.3 ÓXIDO NITROSO E SEU POTENCIAL DE AQUECIMENTO GLOBAL .....	23
2.4 QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO E RELAÇÕES COM A MICROBIOTA DO SOLO.....	24
2.5 ANÁLISES MOLECULARES DA MICROBIOTA DO SOLO .....	25
<b>3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	26
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 OBJETIVO GERAL .....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 AVALIAÇÕES EM CAMPO .....	27
<b>5.1.1 Áreas de estudo</b> .....	27
<b>5.1.2 Estimativa do fluxo de emissão de N<sub>2</sub>O a partir do solo</b> .....	28
<b>5.1.3 Amostragem do Solo</b> .....	31
<b>5.1.4 Análises Químicas do Solo e do Resíduo Vegetal</b> .....	32
<b>5.1.5 Análises Físicas do Solo</b> .....	33
<b>5.1.6 Extração do DNA Genômico do Solo</b> .....	33
<b>5.1.7 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)</b> .....	33
5.2 ENSAIOS DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS .....	35
<b>5.2.1 Experimento em Microcosmos</b> .....	35
<b>5.2.2 Análises Moleculares</b> .....	36
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS .....	37

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	37
6.1 FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO .....	37
6.2 FLUXO DE N <sub>2</sub> O .....	42
<b>6.2.1 Campo</b> .....	42
<b>6.2.2 Microcosmos</b> .....	44
6.3 NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>nirK</i> , <i>nirS</i> E <i>nosZ</i> .....	48
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

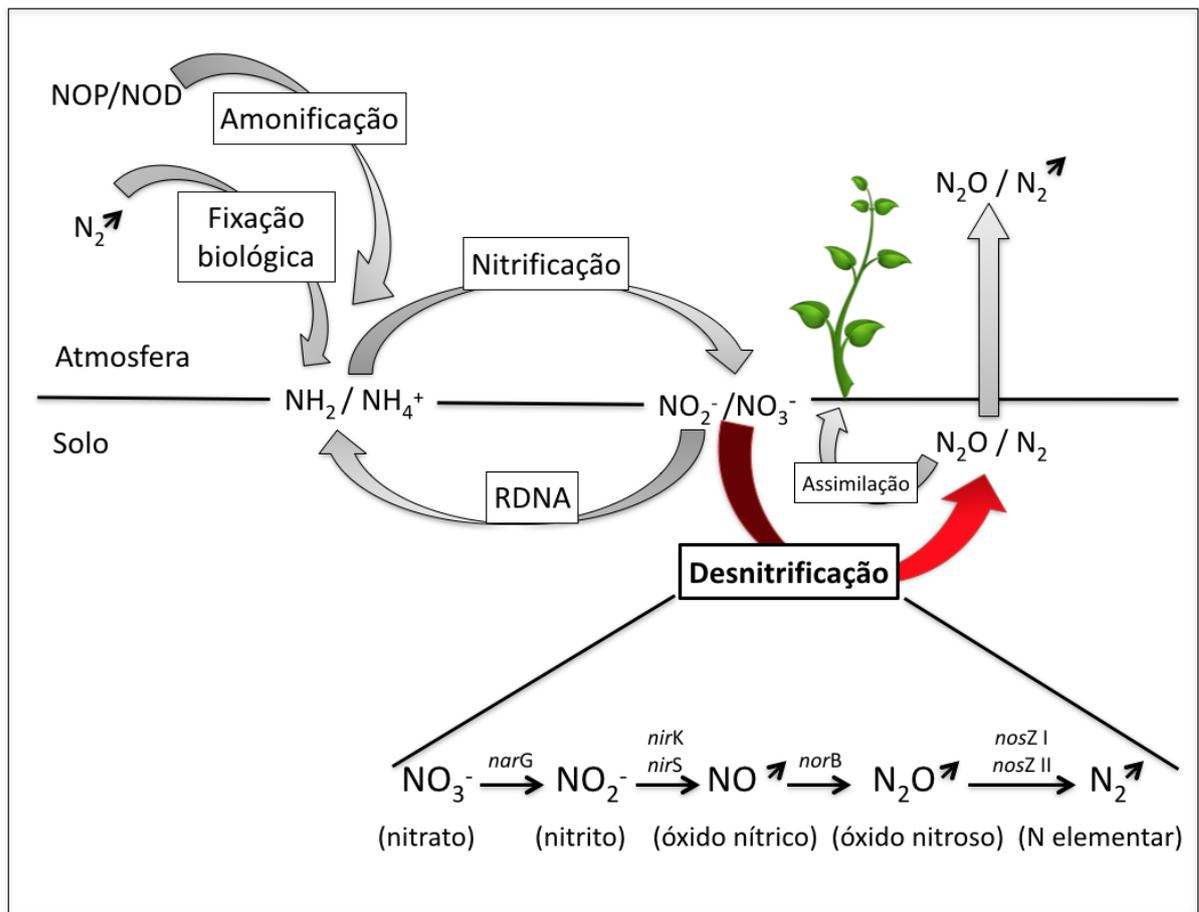
Atualmente, com a alta demanda de produtos madeireiros e o aumento do manejo de terras no Brasil, ocorrem alterações nas paisagens regionais com a conversão de florestas intactas para áreas de cultivos (ZULIANI, et al., 2016; MORTON, et al., 2006). Em 2014, o cultivo de eucalipto no Brasil totalizou uma área de 6,9 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o terceiro maior produtor no país, com 870 mil hectares, perdendo apenas para Minas Gerais (1,7 milhão de hectares) e Mato Grosso do Sul (886,3 mil hectares). O setor da silvicultura contribui para uma parcela importante do PIB brasileiro, representando cerca de 2,6% com as vendas de produtos madeireiros (CAVARARO, 2014; VITAL, 2007). Apesar do caráter sustentável no cultivo do eucalipto, ainda não se dispõe de informações suficientes capazes de indicar possíveis alterações na microbiota do solo decorrentes do plantio de eucalipto.

Além da silvicultura, a citricultura apresenta a maior porcentagem de produção frutífera no Brasil, contribuindo em 2009 com US\$ 6,5 bilhões para o produto interno bruto (PIB) brasileiro, sendo US\$ 4,39 bilhões no mercado interno e US\$ 2,15 bilhões no mercado externo. Somente o estado de São Paulo possui 53% do total da produção mundial de sucos de laranja (NEVES, et al., 2010). Apesar do lucro, é importante conhecer os efeitos do cultivo de citros nas propriedades do solo. Uma vez que o cultivo pode ocasionar desequilíbrio e modificações químicas e biológicas no solo, principalmente diminuindo os macroagregados (importantes micro-habitats para os microrganismos) (BUZINARO, 2006; SANCHES, et al., 1999). Um exemplo são as aplicações de pesticidas e fertilizantes, sendo os primeiros considerados compostos biologicamente ativos e persistentes no solo, devido sua ligação à matéria orgânica. Com isso, os pesticidas podem estimular ou inibir o crescimento da microbiota do solo e, conseqüentemente, alterar a ciclagem de nutrientes no ambiente do solo (BUZINARO, 2006).

Os micro-organismos representam a maior fonte de biodiversidade do solo (TORSVIK, et al., 1990), onde atuam em processos essenciais para todos os ecossistemas terrestres (BISSETT, et al., 2011). Considera-se que os micro-organismos atuam como os mais rápidos e sensíveis indicadores ao uso antrópico do solo (GARCÍA-ORENES, et al., 2013), de forma a responder às alterações no ambiente do solo de diferentes maneiras (POTTHAST, et al., 2012). Devido ao reconhecimento da importância da microbiota do solo, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas, não só para detecção de novos micro-organismos, como também visando avaliar os impactos dos usos e manejo agrícola do solo

sobre as comunidades microbianas presentes no solo. Neste sentido, o estudo de grupos microbianos envolvidos com a ciclagem de nutrientes tem sido recorrente, a fim de compreender como os impactos antrópicos na microbiota podem interferir na funcionalidade do solo e, conseqüentemente, no desenvolvimento do plantio (STROOBANTS, et al., 2014; TORTORA, et al., 2012). A maioria desses estudos sobre os efeitos do uso antrópico do solo sobre a microbiota tem sido conduzida a partir de abordagem independente de cultivo, baseada em métodos moleculares, a fim de avaliar a maior porção da diversidade microbiana presente no ambiente do solo (RODRIGUES, et al., 2013; NAVARRETE, et al., 2011; KURAMAE, et al., 2011).

O uso do solo para atividades agrícolas é também considerado como uma das principais fontes emissoras dos gases do efeito estufa na atmosfera ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2\text{O}$ ) (TIAN, et al., 2016; BRASIL, 2004) e, assim, o estudo dos efeitos do manejo agrícola sobre os grupos microbianos que atuam dentro dos ciclos biogeoquímicos é de grande importância. Os genes funcionais microbianos *nirS/K* e *nosZ* são responsáveis por codificar enzimas essenciais para o processo de desnitrificação (Figura 1). As enzimas nitrito redutases codificadas pelos genes *nirS* e *nirK* catalizam reações de redução do íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) à óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), sendo que as enzimas codificadas pelo gene *nirK* diferenciam-se por possuírem cobre como centro de reação. Em continuidade, as enzimas óxido nitroso redutases codificadas pelo gene *nosZ* reduzem o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) à nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) (KANDELER, et al., 2006). Estudos têm mostrado que os resíduos das culturas afetam a taxa de desnitrificação (TIAN, et al., 2016; KLEMEDTSSON, et al., 1991), mediante, principalmente, o aumento da disponibilidade de C orgânico no solo, um dos fatores mais importantes para a desnitrificação (TIEDJE, et al., 1982). Segundo Clark et al. (2012), as propriedades físicas e químicas do solo (densidade, pH, matéria orgânica, C orgânico, N e razão C:N) também podem influenciar a atividade potencial de desnitrificação resultando em aumento das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  em solos com matéria orgânica elevada.



**Figura 1.** Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio em ambiente terrestre, NOP = Nitrogênio orgânico particulado; NOD = Nitrogênio orgânico dissolvido; RDNA = Redução dissimilatória do nitrato a amônia, seta = as formas gasosas do nitrogênio

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 MUDANÇAS DE USO DA TERRA E MANEJO AGRÍCOLA DO SOLO

O Brasil é um dos maiores exportadores mundiais de alimentos, tendo como principais culturas a soja, o milho, arroz, feijão e a cana-de-açúcar (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016). O solo, como base do sistema de produção de alimentos, é um recurso natural indispensável para o equilíbrio entre os compartimentos ambientais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). Neste sentido, a mudança do uso do solo tem gerado preocupações quanto a fertilidade desse solo a longo prazo. Em situações de uso de fertilizantes nitrogenados pelo manejo agrícola, por exemplo, aumenta-se a disponibilidade de nitrogênio no solo, podendo aumentar o fluxo de emissão de óxido nitroso devido à maior competição por nutrientes entre a biomassa viva desse local. Análises físico-químicas são comumente feitas para se obter parâmetros sobre a saúde do solo. Porém, tais técnicas podem ser parciais, uma vez que os micro-organismos do solo são altamente mutáveis e vulneráveis às mudanças sazonais e umidade (BERNARDES, 2014).

Conversões de uso do solo, como de áreas florestais para pastagens e/ou áreas agrícolas e, conseqüentemente, o uso de compostos químicos, mostraram importantes funções na mudança da microbiota do solo (BONANOMI et al., 2016; LING et al., 2016; QIN et al., 2016). Segundo Zhu et al. (2016), a aplicação de fertilizantes em plantações de milho pode induzir alterações nas comunidades microbianas localizadas na rizosfera, as quais auxiliam na proteção da planta contra patógenos (BERENDSEN et al., 2012). A acidificação de solos é comum frente as aplicações de fertilizantes, fator que pode modificar a abundância de comunidades específicas presentes no solo (BONANOMI et al., 2016). Ling et al, (2016) apresentou resultados significantes quanto a mudança da microbiota em solos submetidos a fertilização por longo prazo em áreas agrícolas da China. Além dos fertilizantes, os autores também consideraram os fatores sazonais, enfatizando que os diferentes níveis de precipitações nas áreas analisadas também tiveram influencia nessa mudança da microbiota. Por conseqüência, o monitoramento da qualidade do solo torna-se essencial para manter as funções desempenhadas por este ecossistema.

## 2.2 MICRO-ORGANISMOS COMO BIOINDICADORES DA MUDANÇA DO USO DO SOLO

A atividade agrícola juntamente com a agropecuária, participam de uma importante parcela no PIB brasileiro, correspondendo à 23 % do total em 2014 (PORTAL PLANALTO, 2015). O manejo agrícola tem sido amplamente discutido devido aos possíveis desequilíbrios no solo, como já mencionado anteriormente. Tais desequilíbrios podem ser ocasionados pelas aplicações de pesticidas e fertilizantes, sendo os primeiros considerados compostos biologicamente ativos e persistentes no solo, devido sua ligação à matéria orgânica. Com isso, os agrotóxicos podem estimular ou inibir o crescimento da microbiota do solo e, conseqüentemente, alterar a ciclagem de nutrientes no ambiente (BUZINARO, 2006). Além das práticas agrícolas, a conversão de solos nativos para pastagens e/ou campos de cultivos também podem apresentar alterações aos parâmetros de equilíbrio de um solo (VENTER et al., 2016). Fatores físico-químicos como a estrutura, pH, quantidade de carbono e nitrogênio e umidade são assiduamente considerados quando se trata de um solo fértil. Todavia, tratando-se de fatores biológicos, a biomassa viva é imprescindível na bioquímica do solo, ciclando os nutrientes e interligando os compartimentos físicos, químicos e biológicos (macro e microbioma).

Os micro-organismos representam a maior fonte de biodiversidade do solo (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990), onde atuam em processos essenciais para todos os ecossistemas terrestres e para o manejo sustentável dos sistemas agrícolas (BISSETT et al., 2011). A fração biológica do solo pode ser dividida em frações viva e morta, sendo os microrganismos parte da biomassa viva, e os teores de C lábeis, bem como os demais compostos orgânicos, classificados como a biomassa morta. Os microrganismos são os principais responsáveis pela disponibilidade de nutrientes às plantas, devido a sua participação nos processos de mineralização, permitindo a liberação gradual desses nutrientes e evitando perdas dos mesmos por lixiviação (MENDES et al., 2009). A microbiota, mesmo representando de 1 % a 5 % da biomassa total do solo, se recicla dez vezes mais que a biomassa morta (95 % - 99 %) podendo armazenar 100 kg de nitrogênio, 80 kg de fósforo, 70 kg de potássio e 11 kg de cálcio por hectare (ANDREOLA; FERNANDES, 2007). Considera-se que os microrganismos atuam como os mais rápidos e sensíveis bioindicadores ao uso antrópico do solo (GARCÍA-ORENES et al., 2013), de forma a responder às alterações no ambiente do solo de diferentes maneiras (POTTHAST; HAMER; MAKESCHIN, 2012). Tais alterações podem resultar no aumento ou diminuição de comunidades microbianas, uma vez

que a fração biológica do solo também possui relação direta com as frações químicas e físicas (MENDES et al., 2009).

A alta sensibilidade e a rapidez nas repostas às perturbações ambientais, caracterizam os micro-organismos do solo como importantes indicadores para o biomonitoramento de áreas cultivadas. Devido ao reconhecimento da importância dessa microbiota, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando avaliar os impactos dos usos e manejo agrícola do solo sobre as comunidades microbianas presentes (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2002).

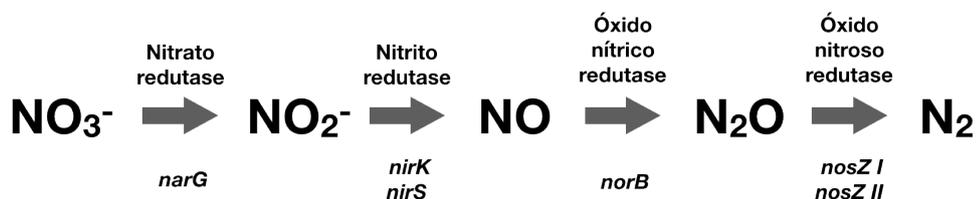
Dentre as possibilidades de análises às alterações ocasionadas aos micro-organismos do solo, existem técnicas como a do clorofórmio-fumigação-incubação – CFI (JENKINSON; POWLSON, 1976) e clorofórmio-fumigação-extração – CFE (VANCE et al., 1987). Ambos os métodos determinam o tamanho da biomassa se baseando no fluxo de CO<sub>2</sub> (carbono prontamente mineralizável) emitido das amostras, ou extraindo o carbono orgânico por meio do uso de um extrator fraco, respectivamente (MENDES et al., 2009). Porém, há limitações em tais técnicas, uma vez que as atividades microbianas são propensas às variações sazonais (ZILLI et al., 2003). Assim, com os avanços em biologia molecular tornou-se possível acessar e caracterizar grande parte da diversidade de comunidades microbianas até então desconhecida, podendo ainda as identificar com maior especificidade (MENDES et al., 2009).

Sendo a microbiota responsável pela ciclagem de nutrientes, o aumento nas emissões de gases do efeito estufa como o dióxido de carbono, metano e o óxido nitroso (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O), possui relação com alterações nas comunidades chaves dos processos de formação desses gases (ZSCHORNACK et al., 2016). Dessa forma, a mudança de uso do solo, bem como a conversão de áreas florestais para lavoura e/ou pastagem, apresenta significativa alteração na microbiota e consequente alteração na ciclagem dos nutrientes. Comunidades metanogênicas (produtoras de CH<sub>4</sub>), por exemplo, são favorecidas em ambientes com alta umidade e ricos em material orgânico, devido a maior disposição de C lábil (ZSCHORNACK et al., 2016). Tal fator pode ocorrer em culturas irrigadas como a de arroz, ou em locais úmidos e ricos em material orgânico como as florestas tropicais. Com relação a emissão de N<sub>2</sub>O, a baixa difusão de oxigênio no solo propicia uma maior conversão do NO a N<sub>2</sub>O pelos microrganismos desnitrificantes e, conseqüentemente, a emissão deste gás à atmosfera (DAVIDSON et al., 2000). Assim, mudanças no uso do solo podem gerar ambientes ideais para os microrganismos produtores destes gases, potencializando as emissões.

### 2.2.1 Bactérias, genes e enzimas da desnitrificação

Sendo reconhecida a importância do processo de desnitrificação desde sua descoberta, em 1886, os micro-organismos responsáveis por esse metabolismo eram inicialmente restritos a algumas espécies, como: *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas denitrificans*, e *Pseudomonas perfectomarinus*. Esses micro-organismos eram isolados e caracterizados bioquimicamente e morfologicamente (GAMBLE, et al., 1977). Atualmente, tendo em vista os avanços nas áreas de genética e biologia molecular, tem sido possível análises mais complexas e, conseqüentemente, o conhecimento de micro-organismos desnitrificantes recalcitrantes ou ainda não cultivados, gerando uma nova perspectiva para a ecologia microbiana (NAVARRETE, et al. 2015). Com base em estudos a nível molecular, muitos genes envolvidos na codificação de proteínas chaves no processo de desnitrificação puderam ser conhecidos. Por meio da detecção desses genes em alguns micro-organismos, foi possível incluir alguns micro-organismos como desnitrificantes: *Sinorhizobium meliloti*, que possui o gene *nirK*; *Pseudomonas fluorescens*, portador do gene *nirS*; *Bradyrhizobium japonicum*, portador do gene *nosZ* classe I; e *Gemmatimonas aurantiaca*, o qual possui o gene *nosZ* classe II, também responsável pela conversão de  $N_2O$  a  $N_2$  (BUENO et al., 2015; NAVARRETE, et al. 2015).

Sendo assim, diversos genes envolvidos na ciclagem do nitrogênio foram estudados para o melhor entendimento de tal ciclo. A desnitrificação, como etapa final do ciclo do nitrogênio, possui diversos genes responsáveis pela codificação de enzimas chaves do processo, estando os principais citados na Figura 2.



**Figura 2.** Etapa da desnitrificação contendo os principais genes codificadores das enzimas correspondentes a etapa (Adaptado de ALVAREZ et al., 2014)

Utilizando modelos bacterianos como a *Proteobacteria Pseudomonas* spp. e o *Paracoccus denitrificans*, sabe-se que a desnitrificação inicia com a presença de enzima nitrato redutase de membrana (*narGHI*) ou periplásmica (*napABC*). Em um segundo caso, na redução assimilatória do nitrato, a enzima nitrato redutase é dependente de NADH (*nasA/C*).

Em seguida, já com a conversão de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), as enzimas nitrito redutases podem converter o  $\text{NO}_2^-$  a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (*NrfA* e *nasC*) ou a óxido nítrico (*nirS* e *nirK*), sendo a última codificadora de enzimas dependentes de cobre). Considerando o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), a conversão do mesmo a  $\text{N}_2\text{O}$  é feita pela enzima óxido nítrico redutase, codificada pelos genes *norB*. Em muitos microrganismos desnitrificantes há a redução de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , feito pela enzima óxido nitroso redutase codificada pelo gene *nosZ* (ALVAREZ, et al., 2014).

### 2.3 ÓXIDO NITROSO E SEU POTENCIAL DE AQUECIMENTO GLOBAL

Dentre os principais gases do efeito estufa, o óxido nitroso possui o maior potencial de aquecimento global, sendo 265 vezes mais potente que o  $\text{CO}_2$  e possuindo tempo de vida superior a 121 anos (BORTOLI, et al., 2012) (Tabela 1). O potencial de aquecimento global é apresentado em  $\text{CO}_2$  equivalente, sendo este

**Tabela 1.** Potencial de aquecimento global dos três principais gases do efeito estufa em um horizonte de 100 anos, com valores relativos ao  $\text{CO}_2$

Gás	Fórmula química	Potencial de aquecimento global (100 anos)
Dióxido de carbono	$\text{CO}_2$	1
Metano	$\text{CH}_4$	28
Óxido nitroso	$\text{N}_2\text{O}$	265

Fonte: *IPCC Fifth Assessment Report* (2014)

A emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  ocorre de forma natural no ambiente, podendo ser intensificada por atividades humanas, como a aplicação de fertilizantes nitrogenados na agricultura. Sendo esta prática responsável por valores entre 65 a 80% do  $\text{N}_2\text{O}$  emitido para a atmosfera (BORTOLI, et al., 2012). Considerando maior disponibilidade de nitrogênio no solo e condições favoráveis de umidade, cerca de 1,5% do fertilizante nitrogenado aplicado pode ser emitido para a atmosfera na forma de  $\text{N}_2\text{O}$  (NETO, et al. 2010; WEITZ, et al., 2001). A formação de  $\text{N}_2\text{O}$  pode ocorrer por meio da nitrificação heterotrófica, co-desnitrificação, e/ou redução dissimilatória do nitrato a amônia. O processo ocorre inicialmente com a nitrificação, sendo em duas etapas: oxidação da  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , via  $\text{NO}_2^-$ , podendo ocorrer por meio de bactérias ou arqueias. O gene *amoA*, codificador da enzima amônia monooxigenase é considerado a chave do processo de nitrificação, podendo ocorrer o  $\text{N}_2\text{O}$  como intermediário. Em seguida há a desnitrificação, processo que consiste na redução do nitrato/nitrito à forma gasosa de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), tendo como intermediários o  $\text{NO}$  e o  $\text{N}_2\text{O}$ , obrigatoriamente, como supracitado (HARTER, et al., 2014). A umidade apresenta importante papel na ciclagem de

nutrientes, uma vez que é essencial no transporte e disponibilidade de compostos como o carbono orgânico, por exemplo (WEITZ, et al., 2001). Sendo assim, estudos envolvendo conversões de áreas nativas em áreas de cultivo agrícola tornam-se fundamentais para o melhor entendimento das alterações nas emissões de  $N_2O$  a atmosfera.

### 1.1 QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO E SUAS RELAÇÕES COM A MICROBIOTA

Fatores como a umidade, disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura possuem relações diretas com a microbiota do solo, uma vez que cada microrganismo possui suas condições ideais de sobrevivência. Sendo assim, comunidades relacionadas ao ciclo do nitrogênio, mais especificamente ao processo de desnitrificação, também têm suas ações modificadas por esses fatores. Segundo Butterbach-Bahl e colaboradores (2013), a umidade pode ser considerada como o fator principal no controle da emissão de  $N_2O$ , devido tal condição regular a disponibilidade de oxigênio aos microrganismos. Além disso, os autores afirmam que, dependendo do tipo de solo, em umidades de 70-80% *water-filled pore space* (WFPS; espaço de poros preenchidos por água) ocorrem maiores emissões de  $N_2O$ . Sendo que em umidades maiores que 80%, inicia-se a formação de  $N_2$ , devido à maior restrição a  $O_2$ , beneficiando os microrganismos anaeróbicos restritos. Além disso, o fator temperatura atua fortemente nos processos bioquímicos da produção de  $N_2O$ , podendo estimular a ciclagem do nitrogênio, tendo consumo de  $O_2$  e, conseqüentemente, gerando um ambiente anóxico ideal para a produção de  $N_2O$  pelos microrganismos (MAZZETTO et al., 2016).

A estrutura do solo apresenta importante papel dentro da bioquímica entre os ecossistemas, uma vez que os agregados são excelentes micro-habitats para os microrganismos. Tal estrutura é composta por partículas de areia, silte e argila, contendo resíduos vegetais, envolvidos por compostos orgânicos como mucilagens ou polissacarídeos, formando um ambiente ideal para bactérias e arqueias (GOLCHIN et al., 1994). Cerca de 80% dos microrganismos do solo podem ser encontrados nos microporos de microagregados (ZILLI et al., 2003). Segundo Schimiguel et al. (2014), os agregados do solo apresentam importante papel na disponibilidade de ar, água e nutrientes às raízes das plantas, não só pelo aumento da porosidade do solo, como também devido ao maior favorecimento aos processos bioquímicos realizados pelos microrganismos. Para tal, o aumento de carbono lábil, por exemplo, disponibilizado na degradação dos resíduos de plantas torna-se uma importante fonte de nutriente à microbiota que reside nesses agregados. O manejo agrícola convencional influencia diretamente na estrutura do solo, destruindo os agregados por meio da aração e, conseqüentemente, modificando as comunidades bióticas desses locais. O conjunto de fatores

químicos e físicos apresentam papéis essenciais no equilíbrio deste ecossistema, sendo fortemente dependentes entre si e, conseqüentemente, importantes para as comunidades microbianas.

## 1.2 ANÁLISES MOLECULARES DA MICROBIOTA DO SOLO

Os estudos de grupos microbianos têm sido recorrentes, a fim de compreender como os impactos antrópicos na microbiota podem interferir na funcionalidade do solo e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos plantios (STROOBANTS, et al., 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A maioria desses estudos sobre os efeitos do uso antrópico do solo sobre a microbiota tem sido conduzida a partir de abordagem independente de cultivo, baseada em métodos moleculares, a fim de avaliar a maior porção da diversidade microbiana presente no ambiente (RODRIGUES et al., 2013; NAVARRETE et al., 2011; KURAMAE et al., 2011). As análises de metagenômica permitiram ampliar de forma significativa o conhecimento sobre as espécies de microrganismos do solo, o que previamente era impossível com técnicas baseadas em cultivo. Segundo Amann et al. (1995), os microrganismos cultiváveis em laboratório constituem apenas de 0,1 a 1% da microbiota total do solo.

Baseando-se em técnicas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), muitas pesquisas envolvendo grupos específicos de organismos foram feitas, permitindo uma maior compreensão da comunidade microbiana presente no solo. Outros exemplos de técnicas para análises moleculares amplamente empregadas para o estudo de comunidades microbianas presentes no solo são as técnicas de PCR e Real Time PCR, a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), AFDRA (*Amplified Functional DNA Restriction Analysis*) e ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (OSBORN et al., 2000). Com o desenvolvimento de sequenciadores de nova geração e da bioinformática, o processamento de dados e uma melhor exploração dos resultados obtidos foi possível. Sendo assim, grande parte das pesquisas utilizam dessa ferramenta para reunir as informações e associar com análises paralelas, como análises físico-químicas (FAKSRI et al., 2016). Com a bioinformática, a junção de milhões de sequências gênicas pôde ser feita a fim de se obter mais informações sobre os grupos microbianos existentes em um solo e, conseqüentemente, sua função no local (BERNARDES, 2014).

Diversas análises que avaliam a relação entre o manejo agrícola e alterações ao solo tomam como base indicadores físicos e químicos, negligenciando análises da porção viva do solo. Dentre as principais comunidades microbianas encontradas no solo, tem-se os

microrganismos presentes na reciclagem de nutrientes, como o nitrogênio. O uso do solo para atividades agrícolas é considerado como uma das principais fontes emissoras dos gases do efeito estufa na atmosfera (TIAN, et al., 2016; BRASIL, 2016) e, assim, o estudo dos efeitos do manejo agrícola sobre os grupos microbianos que atuam dentro dos ciclos biogeoquímicos também se torna de grande importância.

### **3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

Com base no exposto acima foram definidas duas hipóteses científicas, a quais foram avaliadas no âmbito dessa pesquisa:

*Hipótese I.* Solos florestais diferem de solos cultivados com eucalipto e citros quanto a emissão de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O).

*Hipótese II.* A comunidade microbiana desnitrificante de solos florestais diferem de solos cultivados com eucalipto e citros.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral foi avaliar a relação entre as características físicas e químicas do solo com a emissão de N<sub>2</sub>O, e as relações da comunidade microbiana desnitrificante em solos naturais e agrícolas com as características químicas dos resíduos vegetais depositados em superfície e fatores físicos e químicos do solo em períodos seco e úmido.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A fim de avaliar as hipóteses descritas acima, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

##### *Hipótese I*

a) Avaliar o efeito da sazonalidade (período seco e úmido) nos fluxos de N<sub>2</sub>O a partir de solos sob cultivo de eucalipto e citros, e vegetação nativa adjacente;

b) Correlacionar os teores de C solúvel, C e N totais, nitrato e nitrito no solo e a umidade, densidade e porosidade total do solo sob cultivo de eucalipto e citros e vegetação nativa adjacente às áreas agrícolas a partir de amostras de solo coletadas em período seco e úmido,

### *Hipótese II*

c) Quantificar a abundância de bactérias desnitrificantes (comunidades contendo os genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*) utilizando PCR quantitativo em tempo real a partir de amostras de solo coletadas sob cultivo de eucalipto e citros e vegetação nativa adjacente às áreas agrícolas em período seco e úmido, e mantidas em microcosmos;

d) Analisar as características químicas (C e N total e C:N) dos resíduos florestais (vegetação nativa) e das culturas de eucalipto e citros e fatores químicos (C solúvel, C e N totais, nitrato, nitrito) e físicos (umidade, densidade e porosidade total do solo) do solo sob tais resíduos mantidos em microcosmos.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

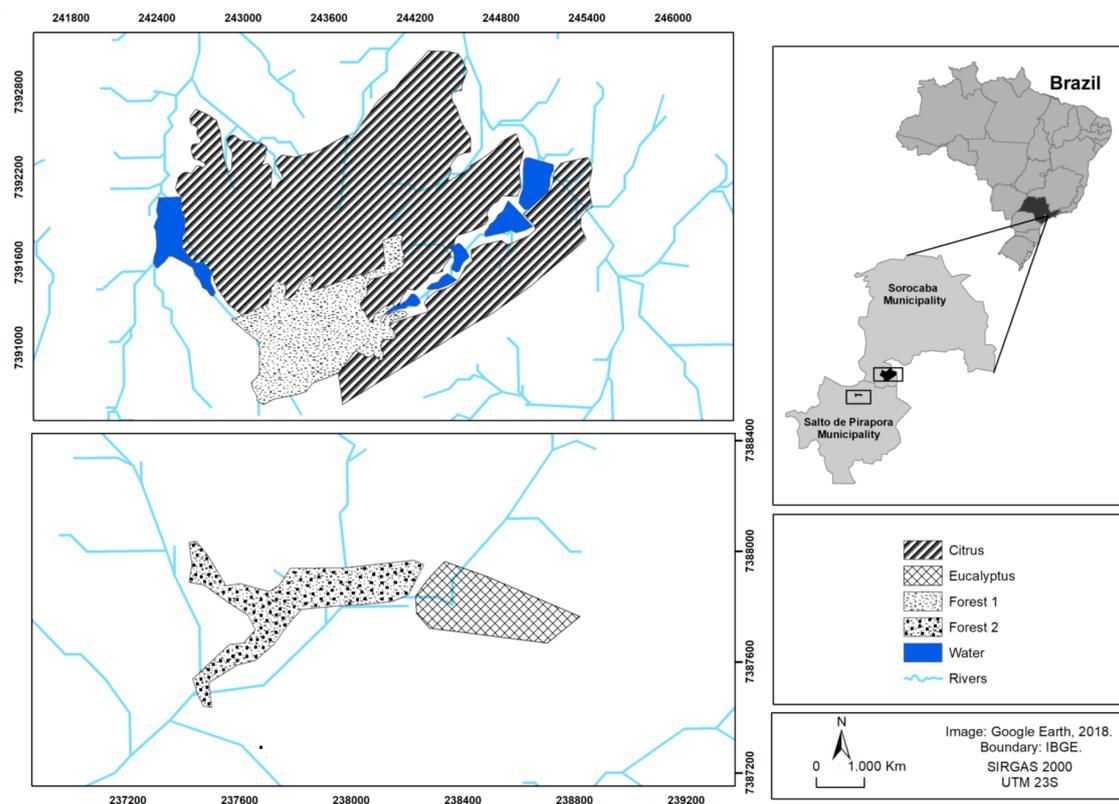
A avaliação das hipóteses I e II envolveu amostragem em campo e a partir de solos incubados em microcosmos mantidos em laboratório. Ambas as avaliações (campo e microcosmos) foram conduzidas a partir de amostragens de solos em período seco (julho de 2016) e período úmido (janeiro de 2017) nas áreas de estudo.

### **5.1 AVALIAÇÃO EM CAMPO**

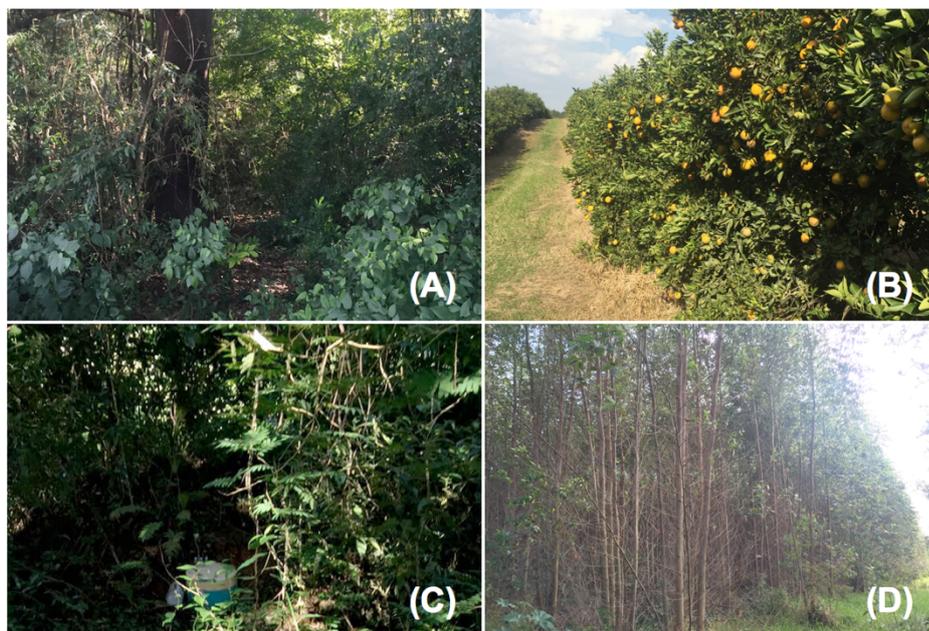
#### **5.1.1 Áreas de estudo**

Quatro diferentes áreas foram estudadas: duas áreas agrícolas, sendo uma delas utilizada com citros (23° 34' 35,76" S; 47° 30' 58,95" O) e outra utilizada com eucalipto (23° 36' 07,92" S; 47° 33' 42,72" O) e duas áreas sob vegetação nativa (fragmento florestal em estágio de regeneração natural), sendo uma delas adjacente à área cultivada com citros, denominada 'Floresta 1' (23° 34' 14,21" S; 47° 30' 50,23" O) e outra adjacente à área sob plantio de eucalipto, denominada 'Floresta 2' (23° 35' 54,13" S; 47° 33' 58,56" O) (Figura 3). Dentre as quatro áreas de estudos, as áreas 'Citros' (Figura 4B) e 'Floresta 1' (Figura 4A) estão localizadas na Fazenda São Pedro no município de Sorocaba, SP, possuindo uma área total aproximada de 431,5 ha, sendo a área de plantio de citros com aproximadamente 333,7 ha. Anteriormente ao cultivo de laranjas nesta área, a mesma era utilizada para pastagem de gado e para criação de cavalos, com posterior uso para plantio de hortaliças. A fertilização

ocorre três vezes ao ano, não tendo sido realizada previamente às coletas. Somente em 1990 se iniciou o plantio de citros, o qual permanece até os dias atuais. O pomar utilizado nesse estudo foi inserido em 06 de janeiro de 2006, tendo doze anos atualmente. Segundo registros de 18/08/1965 e 29/07/1970, a vegetação florestal na área ‘Floresta 1’ está sob estágio avançado de regeneração, sem registros de perturbação antrópica nos últimos 52 anos. Por sua vez, as áreas ‘Eucalipto’ (Figura 4D) e ‘Floresta 2’ (Figura 4C) estão localizadas em propriedade particular no município de Salto de Pirapora, SP. A área de cultivo de eucalipto possui 38 ha, tendo sido o solo submetido a adubação no momento de plantio, e também nove e dezoito meses após o plantio. Além disso, há registro de combate a formigas nesta área, sendo utilizada para o plantio de eucalipto nos últimos dez anos. A vegetação presente nesse trabalho possuía aproximadamente 4 anos de idade no momento da última coleta. A área de floresta adjacente ao cultivo de eucalipto tem 10 ha, e encontra-se em estágio avançado de regeneração natural, sem registro de perturbação antrópica nos últimos 50 anos (Figura 4).



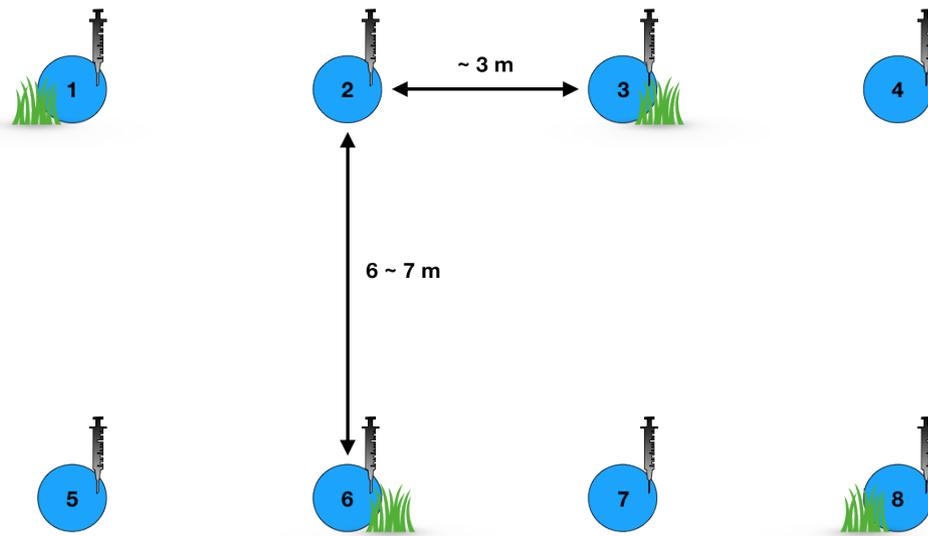
**Figura 3.** Áreas de amostragem localizadas no sudeste do Brasil. O pomar de citros e a floresta a ele adjacente, Floresta 1, estão localizados no município de Sorocaba ( $23^{\circ} 34' 35,76''$  S;  $47^{\circ} 30' 58,95''$  O e  $23^{\circ} 34' 14,21''$  S;  $47^{\circ} 30' 50,23''$  O, respectivamente); e o plantio de eucalipto e o fragmento florestal a ele adjacente, Floresta 2, estão localizados no município de Salto de Pirapora ( $23^{\circ} 36' 07,92''$  S;  $47^{\circ} 33' 42,72''$  O e  $23^{\circ} 35' 54,13''$  S;  $47^{\circ} 33' 58,56''$  O, respectivamente)



**Figura 4.** Áreas de estudo utilizadas para coleta de amostras de gases e solo. (A) ‘Floresta 1’, adjacente ao pomar de citros; (B) Pomar de citros; (C) ‘Floresta 2’, adjacente ao plantio de eucalipto; e (D) Plantio de eucalipto

### 5.1.2 Estimativa do fluxo de emissão de $N_2O$ a partir do solo

A coleta de fluxo de emissão de  $N_2O$  foi feita a partir do solo sob cultivo de citros, plantio de eucalipto e vegetação nativa adjacente às áreas agrícolas. O procedimento para as coletas de  $N_2O$  foi baseado no método descrito por Davidson et al., (2002), instalando-se oito câmaras aleatoriamente em cada área de estudo. Para os cálculos dos fluxos diários, as câmaras estáticas foram fixadas na superfície do solo por meio de movimentos rotacionais, de forma a minimizar alterações no material orgânico da superfície e assegurar boa vedação (Figura 5). Nas áreas de cultivo, citros e eucalipto, as câmaras foram instaladas na linha do plantio, onde a cobertura do solo se mantém mais intacta. As câmaras foram mantidas abertas, sendo fechadas apenas para a coleta de gases, sendo essas iniciadas no período seco na região de Sorocaba que normalmente ocorre entre os meses de julho e agosto. As coletas foram finalizadas no período úmido da região, o qual ocorre normalmente nos meses de janeiro e fevereiro. Os horários de coleta variaram entre oito da manhã e meio dia, tendo variações nos horários de coletas para cada área de estudo.



**Figura 5.** Esquema representativo da disposição espacial das câmaras estáticas utilizadas para a coleta de gases em campo. O espaçamento entre as câmaras na horizontal foi de aproximadamente 3 metros; e o espaçamento na vertical variou de 6 a 7 metros, dependendo da área de estudo

Os dias de coleta dos gases foram determinados em função da coleta de solo para as análises físico-químicas e microbiológicas. A coleta de amostras de gás para a obtenção do fluxo ocorreu nos tempos de 1, 10, 20 e 30 minutos após o fechamento da câmara, compreendendo quatro dias de coletas para cada ponto e totalizando 32 amostras para cada área/dia. Durante a coleta de gás, também foram coletados dados de temperatura do ar, temperatura do solo, pressão atmosférica, e três medidas aleatórias da altura de cada câmara para o cálculo de fluxo (Figura 6).



**Figura 6.** Câmara estática utilizada para coleta de gás. A imagem mostra uma câmara tampada, com seringa de coleta acoplada, frascos de amostragem, termômetro e cronômetro

As amostras de gás foram coletadas das câmaras através de seringas plásticas B.D. (Cremer S.A., Blumenau, Santa Catarina, Brasil) de 60 mL e, então, foram imediatamente transferidas para frascos de vidro de 30 mL, previamente higienizados, identificados, vedados com septos de borracha estilo rolha e evacuados (Bellco Glass, Vineland, NJ, EUA), de acordo com procedimento descrito por Neto et al., (2011).

Um orifício sobre a tampa da câmara foi confeccionado para manter a pressão interna igual à pressão atmosférica. Após o término da coleta, os frascos contendo as amostras foram levados para o Laboratório de Mudanças Climáticas, localizado na UFSCar, *Campus* de Sorocaba, onde as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2014 (Shimadzu, Columbia, MD, EUA). As amostras foram injetadas em períodos máximos de um mês após a data de coleta. Em Carmo et al., (2012), foi constatado em análises laboratoriais que as concentrações de N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> não são afetadas quando as análises são realizadas a partir de amostras armazenadas por até 30 dias. Para cálculo das concentrações dos gases por comparação das áreas dos picos onde ocorre a integração, foram utilizados padrões previamente preparados (Scott-Marrin, Riverside, CA, USA). O fluxo de N<sub>2</sub>O foi calculado por meio da variação da concentração nos valores desse gás com o tempo, obtendo-se uma regressão linear baseada na curva gerada a partir dos quatro tempos de coleta dentro de intervalos de 40 minutos. Para calcular os fluxos, de acordo com a região interna da câmara, os volumes molares de gás foram corrigidos, considerando-se a temperatura ambiente e a pressão atmosférica, medidas no momento da amostragem (JANTALIA et al., 2008).

### **5.1.3 Amostragem do Solo**

Em cada área de estudo, as amostras de solo para extração de DNA, análises físicas e químicas e preparo do experimento em microcosmos foram coletadas a partir de cinco pontos amostrais utilizando tubos de PVC (5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, tendo as amostras profundidade de 0 - 10 cm) previamente esterilizados. Para tanto, um ponto de amostragem central foi estabelecido próximo à cinco das oito câmaras estáticas utilizadas para a coleta de amostras de gás. A partir deste ponto central foram estabelecidos outros quatro pontos de amostragem, os quais foram posicionados ao sul, norte, leste e oeste com distância de 1 m do ponto central. No total foram coletadas cinco amostras compostas de solos para cada área de estudo, as quais foram adequadamente armazenadas a -20 °C com o propósito de proceder análises moleculares, físicas e químicas. Antes de coletar o solo, a serapilheira foi coletada nos pontos amostrais, seguida da coleta de solo (Figura 7).



**Figura 7.** Coleta de amostras de solo para análises físicas, químicas e moleculares/microbiológicas. (A) Local de amostragem antes da coleta de solo; (B) Amostragem da serapilheira e coleta de solo para análises moleculares; (C) As amostras de solo para análises físicas e químicas também foram coletadas de 0 - 10 cm profundidade, assim como as amostras para experimento em microcosmos; (D) Coleta de amostras de solo para análise de nitrato e amônio

#### 5.1.4 Análises Químicas do Solo e do Resíduo Vegetal

Os valores de pH dos solos de campo foram obtidos em solução de  $\text{CaCl}_2$  a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , como descrito no Manual de análises químicas do solo, plantas e fertilizantes (EMBRAPA, 2009). A concentração de carbono orgânico dissolvido em água (COD) foi determinada a partir das amostras de solo coletadas em campo. Para tanto, procedeu-se extração em água (1 g solo: 100 mL água ultra-pura), mantendo o solo sob agitação por 24 h. O sobrenadante obtido foi centrifugado e filtrado (filtro de membrana de fibra de vidro calcinado a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A quantificação do COD foi realizada por combustão seca em analisador Shimadzu TOC-5000A (Shimadzu, Columbia, MD, EUA) no Laboratório de Matéria Orgânica do Solo na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP). Os teores totais de carbono (C) e nitrogênio (N) e a razão C:N foram determinados por combustão seca pelo equipamento LECO® CN-2000 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) a partir das amostras de solo e resíduos vegetais coletados na superfície do solo sob cultivo de citros e plantio de eucalipto e áreas de

vegetação nativa adjacente às áreas agrícolas, tendo sido necessário para a análise dos resíduos, a completa secagem dos mesmos. Para tal, as amostras de serapilheira foram secas em estufa a 65 °C e trituradas em moinho de lâminas para o melhor processamento das amostras. A extração de nitrato e amônio na solução de solo foi feita por KCl 2 M, sendo que a quantificação de cada composto foi feita por métodos espectrofotométricos como descrito em Norman et al. (1985) e Krom (1980), respectivamente.

#### **5.1.5 Análises Físicas do Solo**

A análise granulométrica dos solos foi feita utilizando o método da pipeta descrita em Camargo et al., 2009, sendo a textura identificada por meio do triângulo para determinação de classes texturais do IAC. A umidade do solo foi determinada por método gravimétrico (EMBRAPA, 2009). Para tanto, 10 g de cada amostra de solo foram secos em estufa a 105 °C e, posteriormente, pesadas para a determinação do peso seco para o cálculo da umidade. A densidade do solo foi obtida pelo método do balão volumétrico (EMBRAPA, 2009). Neste, 20 g de solo foram colocados em balão volumétrico (100 mL de volume), o qual foi preenchido com água. A porosidade total do solo foi determinada com base na metodologia desenvolvida pelo “Manual de métodos de análise de solo” (EMBRAPA, 1999). Todas as determinações foram feitas em triplicatas para cada área de estudo.

#### **5.1.6 Extração do DNA Genômico do Solo**

O DNA genômico das amostras de solo coletadas em campo foi extraído utilizando o *Kit Power Lyzer™ Power Soil® DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante. A concentração e qualidade do DNA foram determinadas em espectrofotômetro tipo *NanoDrop* (NanoDrop® ND-1000 UV/vis-spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) seguido por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1x (10,78 g L<sup>-1</sup> de Tris; 0,58 g L<sup>-1</sup> de EDTA; e 5,50 g L<sup>-1</sup> de ácido bórico) submetidos a 90 Volts por 1 h. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até ser utilizado.

#### **5.1.7 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)**

O número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* foi determinado a partir das diferentes amostras de DNA genômico do solo utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para tanto, curvas padrões foram construídas utilizando 5 diluições em série (variando de 10<sup>2</sup> a 10<sup>7</sup> cópias) de DNA plasmidial contendo os genes de interesse

provenientes de cepas obtidas da coleção alemã *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) – *Sinorhizobium meliloti* (DSM 30135) (*nirK*), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090) (*nirS*) e *Bradyrhizobium japonicum* (DSM 1755) (*nosZ I*). As reações foram feitas no equipamento *QuantStudio™ 3 Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As reações de qPCR foram preparadas em volume de 10 µL contendo 5 µL do *Kit SybrGreen Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), 3,35 µM de cada *primer* (Tabela 2) para os genes *nirK* e *nirS*, e 4,70 µM para o gene *nosZ*, 0,5 µL de BSA a 0,6% e 1 µL da amostra de DNA genômico do solo. As condições utilizadas para amplificação do gene *nirK* foram: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos (40 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 1 segundo. Para o gene *nirS* as condições de amplificação foram: 94 °C por 2 minutos, 95 °C por 15 segundos, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto (50 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 15 segundos. Por fim, o gene *nosZ* foi amplificado utilizando as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos (45 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 15 segundos. A fluorescência foi captada ao final da etapa de extensão em cada ciclo de amplificação. Uma análise da curva de dissociação (*melting curve*) do produto da amplificação foi feita para confirmar se origem dos sinais de fluorescência foi de *amplicons* específicos ou de *primer dimers* e/ou outros artefatos. Análises automatizadas da qualidade (p.e. subtração do ruído de fundo da fase patamar e configuração do ciclo limiar – Ct – na fase de amplificação linear) e quantidade da amplificação foram feitas com o *QuantStudio® Design and Analysis Software* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

**Tabela 2.** Informações sobre os primers que foram utilizados para quantificação do número de cópias de genes funcionais microbianos relacionados com o processo de desnitrificação

Genes	Funções	Sequência dos primers	Referências
<i>nirK</i>	Redução de nitrito a óxido nítrico ou amônia	<i>nirK</i> 876 (ATYGGCGVAYGGCGA) <i>nirK</i> 1040 (GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG)	Henry, et al, (2004) Braker, et al. (1998)
<i>nirS</i>	Redução de nitrito a óxido nítrico	<i>nirS</i> cd3f (GTNAAYGTNAARGARACNGG) <i>nirSR3cd</i> (GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA)	Throckack, et al. (2004)
<i>nosZ I</i>	Redução de óxido nitroso a gás nitrogênio	<i>nosZ2F</i> (CGCRACGGCAASAAGGTSMSST) <i>nosZ2R</i> (CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA)	Henry, et al. (2006)

O número de cópias de cada gene alvo foi calculado por grama de solo utilizando a equação I.

$$I.NC/g\ solo = QC \times 4 \times 100$$

Onde,

NC/g solo = Número de cópias do gene alvo por grama de solo

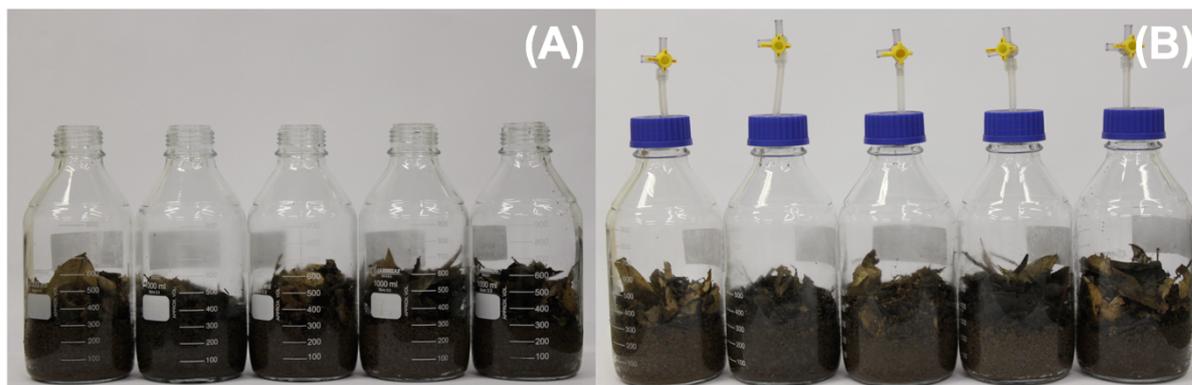
QC = Quantidade de cópias obtida na análise de qPCR

Sendo NC/g solo igual a multiplicação de QC por 4, uma vez que foram utilizados 0,25 g de solo para extração do DNA genômico, seguida da multiplicação desse valor por 100, equivalente ao volume final em microlitros da suspensão de DNA ao término do processo de extração.

## 5.2 ENSAIOS DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS

### 5.2.1 Experimento em Microcosmos

A incubação do solo em microcosmos foi conduzida em duas etapas, sendo uma no período seco (agosto de 2016) e outra no período úmido (fevereiro de 2017). Como já mencionado anteriormente, análises de capacidade de campo (CC), densidade do solo e umidade foram feitas previamente ao preparo dos microcosmos. A montagem de cada microcosmo incluiu o uso da serapilheira coletada em campo, não negligenciando seus efeitos na emissão de N<sub>2</sub>O. Os resíduos de floresta eram compostos por folhas de plantas variadas, cascos de árvore e, em alguns casos, coquinhos secos. Por outro lado, os resíduos de citros e eucalipto, eram uma baixa quantidade de folhas, gramíneas e frutos, seguido de alta quantidade de apenas um tipo de folha seca, respectivamente. Sendo assim, em função da CC, quantidade variada de solo foi adicionada em frascos de vidro com 1,5 L de volume (Figura 8A). A quantidade de resíduo vegetal que foi utilizada em cada microcosmo foi a mesma presente na superfície do solo (em campo) em uma área equivalente à área da base do frasco utilizado para o preparo do microcosmo, respeitando as diferenças na quantidade de serapilheira encontrada nas diferentes áreas de estudo, sendo as áreas de floresta e área de eucalipto, com maiores espessuras do que a área de plantio de citros.



**Figura 8.** Imagem de um subconjunto de frascos utilizados em experimento em microcosmo. (A) Frascos utilizados para a incubação dos solos, com cinco repetições para cada área. (B) Frascos fechados para coleta

A primeira coleta das amostras de gás nos microcosmos foi feita 24 horas após o início da incubação a 40% da capacidade de campo, tendo as demais coletas iniciadas após o ajuste a 70% da capacidade de campo, sendo 1, 7, 15 e 30 dias após este procedimento. Os frascos permaneciam abertos até o momento de coleta, sendo a ventilação feita antes do início da amostragem para garantir a dissipação de qualquer gás que eventualmente tivesse se concentrado junto às amostras de solo. Os frascos foram hermeticamente fechados e seringas de nylon tipo B.D foram utilizadas para a coleta de 20 mL de gás do interior dos mesmos, que foi feita por meio de válvula presente na tampa de cada frasco (Figura 8B). Os tempos de coleta foram em 1, 30, 60 e 90 minutos, após o fechamento dos frascos. A umidade do solo contido nos frascos foi controlada durante o período de experimentação por meio de pesagens diária dos microcosmos, permitindo verificar a quantidade de água perdida. No último dia de coleta de gases, amostras dos solos contidos nos microcosmos foram coletadas para a extração de DNA genômico e subsequentes análises da abundância de bactérias desnitrificantes (comunidades contendo os genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*) utilizando a técnica de qPCR.

### 5.2.2 Análises Moleculares

A extração de DNA a partir das amostras de solo coletadas nos microcosmos foi feita conforme descrito no *item 5.1.6*. O número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* foi obtido a partir das diferentes amostras de DNA genômico do solo utilizando a técnica de qPCR conforme descrito no *item 5.1.7*.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* foram conduzidas a partir do conjunto de dados referentes aos fatores físicos e químicos das amostras de solo e resíduo vegetal para verificar diferenças de tais fatores entre as amostras de solo estudadas. Para tanto, foi utilizado o pacote ‘stats’ do R (versão 1.1.383, R Core Team 2017). Os fluxos de N<sub>2</sub>O foram calculados conforme descrito no *item 5.1.2*. A análise dos resultados obtidos com a técnica de qPCR foi descrita no *item 5.1.7*. Correlações entre os fluxos de N<sub>2</sub>O e as características físicas e químicas do solo foram conduzidas utilizando o pacote ‘ggplot2’ com o programa R (versão 1.1.383, R Core Team 2017) para ambas as avaliações (campo e microcosmos). Da mesma forma foram conduzidas correlações entre a abundância dos genes funcionais analisados por qPCR e os fatores químicos dos resíduos vegetais e os fatores físicos e químicos das amostras de solo.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados os resultados relativos à avaliação da *Hipótese I* juntamente com a discussão dos mesmos.

### 6.1 FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO

Análises físicas do solo foram feitas para as amostras coletadas em cada área de estudo (Tabela 3). As amostras de solo foram coletadas na camada de 0-10 cm a partir da superfície, sendo esse horizonte rico em matéria orgânica o qual influencia na determinação da densidade do solo (BURGHARD E SCHNEIDER, 2018). As porcentagens de argila, areia e silte foram determinadas nas amostras das diferentes áreas estudadas, sendo a textura do solo da área ‘Floresta 1’ definida como argilosa. Por sua vez, a textura dos solos das áreas ‘Citros’, ‘Floresta 2’ e ‘Eucalipto’ foi definido como franco-argilosa-arenosa, franco-arenosa, e franco-argilosa, respectivamente (CAMARGO et al., 2009). Segundo Burns et al. (2015), a textura do solo tem importante papel na porosidade e, conseqüentemente, no microclima gerado para os microrganismos, devido a relação da porosidade com a temperatura, concentração de gás disponível, transporte de água e nutrientes. Os autores também observaram que o teor de argila se relaciona positivamente com a  $\alpha$ -diversidade e a riqueza de espécies do local. Sendo assim, a textura mostrou-se um fator físico importante no controle da microbiota do solo.

Obtendo-se os valores de pH, foi possível observar que o solo da área 'Floresta 1' apresentou valor de pH mais elevado em comparação ao solo das demais áreas de estudo, em ambos os períodos de coleta (Tabela 3). Este fator químico do solo revelou diferenças significativas entre os solos das áreas 'Floresta 1' e 'Citros' em ambos os períodos, e entre as áreas 'Floresta 2' e 'Eucalipto' no período seco. A comparação entre o valor de pH do solo de mesma área em diferentes períodos de amostragem não revelou diferenças significativas para casos estudados. Em muitos estudos, o pH do solo se mostrou um fator importante na seleção dos microrganismos, tendo influenciado a modelagem dessas comunidades em solos de áreas agrícolas, nas quais os valores de pH do solo são alterados com as práticas de manejo do solo (DURRER et al., 2017). Porém, o pH do solo não é o fator único regulador desses microrganismos, devendo ser avaliado juntamente com os fatores químicos do solo que serão citados em seguida (BURNS et al., 2015).

O carbono orgânico dissolvido (COD) representa o teor de carbono lábil, ou prontamente mineralizável, presente nas amostras de solos (Tabela 3). O solo da área de 'Floresta 1' apresentou maiores teores de COD em ambos os períodos de amostragem em relação ao solo das demais áreas de estudo, havendo diminuição do teor de COD no período úmido. Esta diminuição do teor de COD também foi observada para o solo da área cultivada com citros. Opostamente, o solo das áreas denominadas 'Floresta 2' e 'Eucalipto' apresentaram aumento dos teores de COD do período seco para o úmido. Os teores de COD apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre os solos das áreas agrícolas e respectivas áreas florestais, bem como entre os períodos seco e úmido, com exceção das áreas denominadas 'Citros' e 'Floresta 1' para a comparação sazonal. Comparando áreas de 'Citros' e 'Floresta 1', a primeira apresentou teores inferiores ao controle, em ambos os períodos de experimentação. 'Eucalipto' teve menor concentração de COD do que 'Floresta 2' em período seco, mas o oposto é visto no período úmido. Segundo Marques et al. (2012), o teor de COD em solos possui relação direta com o carbono total, bem como com a umidade e a profundidade do solo. Os autores ressaltam que a umidade possui influência quando diferentes profundidades do solo são comparadas, sendo que a dispersão do COD ocorre mais facilmente em ambientes mais úmidos. Em camadas superficiais (0 – 10 cm), como o utilizado nesse estudo, a atividade do COD é influenciada principalmente pelo tipo de cobertura do solo e, também, pela rotação de cultura (MARQUES et al., 2012) (Tabela 3). Além disso, Harter et al. (2014) mostraram correlação positiva entre o teor de COD e fluxo de  $N_2O$ , sendo que em maiores teores de COD há maior emissão de  $N_2O$ , uma vez que há aumento de C lábil como acceptor de elétrons para os microrganismos desnitrificantes.

Apesar de não ter sido revelada correlação significativa entre os teores COD presentes no solo e fluxo de  $N_2O$  determinado em campo, foi possível observar correlação do fluxo de  $N_2O$  com os teores de C e N totais do solo (Figura 10A). Tais teores foram apresentados na tabela 3, tendo o solo da área 'Floresta 1' revelado os maiores valores para ambos os períodos de amostragem. Os teores de C e N variaram de acordo com a sazonalidade nos solos de todas as áreas de estudo, tendo o solo da área 'Citros' valores de N menores ao solo da área 'Floresta 1', e o solo da área 'Eucalipto' valores aproximados ao solo da área 'Floresta 2'. Diferenças significativas relacionadas aos teores de C foram observados nas comparações feitas entre solos da área 'Floresta 1' e 'Citros', em ambas as sazonalidades. Considerando as comparações entre os solos das mesmas áreas de estudo em diferentes períodos, foram reveladas diferenças significativas entre os solos das áreas de 'Floresta 1', 'Citros' e 'Floresta 2', nas quais o período úmido apresentou maior concentração de C total. O solo da área 'Eucalipto', apesar do maior teor de C no período úmido em comparação com o período seco, não apresentou diferença significativa na avaliação sazonal ( $P < 0,05$ ). O teor de N total apresentou alterações em seus valores entre o período seco e úmido, tendo revelado significância estatística para a comparação entre os solos das áreas 'Floresta 1' e 'Citros' em ambas os períodos de amostragem. As comparações entre solo da mesma área em diferentes períodos de amostragem, revelaram significância estatística para todos os casos estudados. Além das diferenças entre áreas de estudo e sazonalidade reveladas, os teores de C e N totais presentes no solo mostraram forte correlação com o fluxo de  $N_2O$  determinado em campo nas áreas de 'Citros' e 'Floresta 1' ( $P < 0,05$ ) (Figura 10A). A aplicação a longo prazo de fertilizantes nitrogenados tem efeito significativo na composição das comunidades bacterianas devido sua sensibilidade a adição nitrogênio no solo (FIERER, et al., 2012).

Os teores de C e N total dos resíduos vegetais também revelaram diferença estatística entre os períodos de amostragem, tendo o resíduo da vegetação coletado no período seco apresentado os maiores valores, com exceção daqueles determinados para a área 'Floresta 1' em que a serapilheira do período úmido apresentou maiores teores (Tabela 3). As análises estatísticas mostraram diferenças significativas entre os teores de C e N do resíduo vegetal das áreas 'Floresta 1' e 'Citros' em ambos os períodos de amostragem, e das áreas 'Floresta 2' e 'Eucalipto' no período seco. Além disso, quando feita a comparação entre o teor de C e N dos resíduos vegetais da mesma área de estudo coletados em períodos diferentes, observou-se diferenças significativas entre os resíduos das áreas 'Citros' e 'Eucalipto'. Nas mesmas áreas, observou-se que os teores de C e N totais dos resíduos vegetais se correlacionaram entre si e com os fatores químicos do solo, tais como C e N totais e COD (Figura 10A).

A razão C:N do solo mostrou-se menores para solos agrícolas comparados aos solos de florestas nativas. Segundo Wan et al. (2015), a razão C:N tem papel fundamental na modelagem da microbiota do solo, sendo responsável pela qualidade de substrato usado pelos microrganismos para seu crescimento.

As análises de nitrato e amônio revelaram uma maior quantidade de nitrato na área de 'Floresta 1' em ambos períodos, seco e úmido, e maior teor de amônio na 'Floresta 2' no período seco, e na 'Floresta 1' no período úmido (Tabela 3). Análises de *Tukey* para nitrato revelaram resultados significativos ( $P < 0,05$ ) apenas entre 'Citros' e 'Floresta 1', e 'Eucalipto' e 'Floresta 2' nos períodos seco e úmido, respectivamente. Por outro lado, as análises estatísticas de amônio mostraram resultados significativos ( $P < 0,05$ ) para todas comparações, exceto entre 'Citros' e 'Floresta 1' em ambos períodos de amostragem. De acordo com Hink et al. (2017), o teor de amônio possui relação com a produção de  $N_2O$ , uma vez que é um intermediário da nitrificação e, em casos diretos, da desnitrificação. Sendo assim, foi possível observar correlação positiva entre amônio e os fluxos de  $N_2O$  nas quatro áreas de estudo, tanto em campo como em microcosmo (Figuras 10 e 12).

**Tabela 3.** Fatores químicos dos resíduos vegetais e fatores físico-químicos dos solos das áreas de ‘Citros’, ‘Floresta 1’, ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’ em período seco e úmido

Atributos	Período seco				Período úmido			
	Citros	Floresta 1	Eucalipto	Floresta 2	Citros	Floresta 1	Eucalipto	Floresta 2
----- <i>Resíduo vegetal</i> -----								
C total (g kg <sup>-1</sup> )	15,6 <sup>a</sup> B±0,8 <sup>§</sup>	22,3aA±2,0	25,8aA±4,4	10,1aB±0,5	8,5bB±0,9	22,9aA±3,1	10,7bA±3,4	9,9aA±1,4
N total (g kg <sup>-1</sup> )	1,2aB±0,1	1,4aA±0,1	0,9aA±0,2	0,6aA±0,2	0,5bB±0,1	1,5aA±0,1	0,4bB±0,1	0,6aA±0,1
----- <i>Solo</i> -----								
COD (ppm)	7,7aB±0,5	15,7aA±2,0	4,2bB±0,2	4,3bA±0,1	7,4aB±0,3	14,4aA±2,8	6,8aA±1,0	6,4aB±0,3
C total (g kg <sup>-1</sup> )	19,0bB±1,2	45,6bA±5,1	20,8aA±2,8	16,0bA±1,6	24,4aB±2,3	69,1aA±6,7	21,2aA±2,1	27,1aA±6,0
N total (g kg <sup>-1</sup> )	2,4bB±0,3	3,6bA±0,5	1,5bA±0,3	1,2bA±0,4	3,1aB±0,2	6,3aA±0,6	2,1aA±0,3	2,3aA±0,4
C:N	7,8aA±0,9	12,3aB ±0,5	12,1aA±1,9	13,3aA±2,2	7,7aB±0,6	10,9aA±0,7	9,9aA±1,8	11,5bA±0,9
Nitrato (mg kg <sup>-1</sup> )	2,1aB±1,1	12,7aA±1,9	0,0aA	2,9aA±1,9	3,1aA±1,1	16,0aA±7,9	0,0aB	3,3aA±1,5
Amônio (mg kg <sup>-1</sup> )	4,6bA±1,4	3,8bA±0,3	1,8bB±0,05	7,6aA±3,1	4,8aA±0,9	11,3aA±7,5	2,5aA±0,4	1,8bB±0,5
pH	5,8aB±1,0	7,0aA±0,1	5,4aA±0,3	4,5aB±0,5	5,7aB±0,7	6,9aA±0,2	5,4aA±0,4	5,0aA±0,4
Densidade do solo (g cm <sup>-3</sup> )	0,89	0,65	0,96	0,96	0,89	0,65	0,96	0,96
Argila (%)	37,45	53,42	44,10	9,00	37,45	53,42	44,10	9,00
Areia (%)	50,49	34,14	20,90	65,79	50,49	34,14	20,90	65,79
Silte (%)	12,1	16,34	35,00	25,22	12,1	16,34	35,00	25,22

<sup>a</sup>Média calculada a partir de cinco repetições

<sup>§</sup>Desvio padrão calculado a partir de cinco repetições

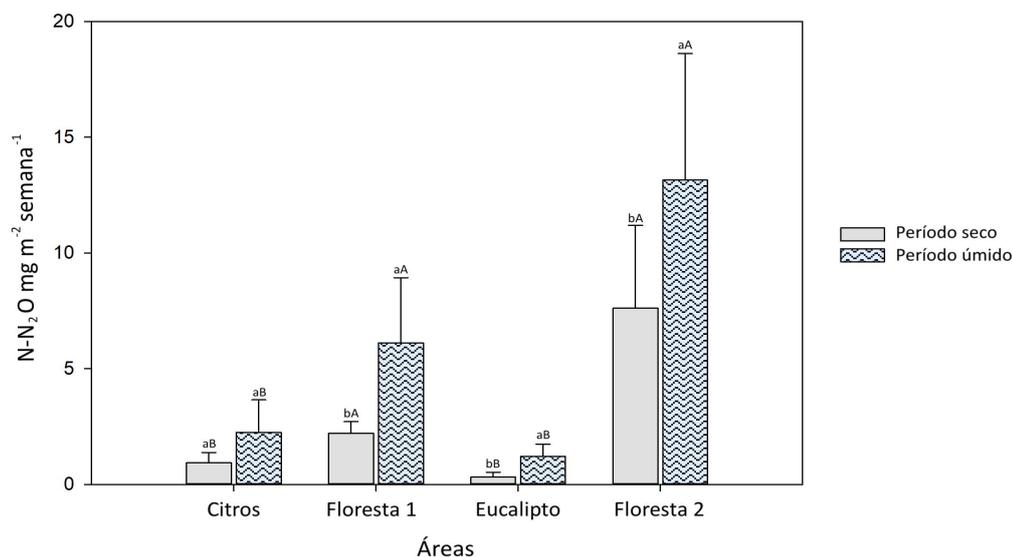
Teste *Tukey* foi feito separadamente para comparar períodos seco e úmido em uma mesma área de amostragem (letra minúscula), e floresta vs. área agrícola adjacente em um mesmo período (letras maiúsculas)

Valores com letras iguais, minúsculas ou maiúsculas, não são significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas

## 6.2 EMISSÃO E FLUXO DE N<sub>2</sub>O

### 6.2.1 Avaliações em campo

As médias dos fluxos acumulados de N<sub>2</sub>O coletados de cada uma das oito câmaras em campo estão representados na figura 9, os quais foram mensurados no período seco e úmido. As áreas sob vegetação ('Floresta 1 e 2') tiveram maiores fluxos de N<sub>2</sub>O, tanto no período seco quanto no período úmido, em relação às áreas agrícolas, sendo a área de 'Floresta 2' com maior emissão de N<sub>2</sub>O dentre as demais.



**Figura 9.** Emissão acumulada semanal em solos sob citros, eucalipto e vegetação florestal adjacente às áreas de cultivo em período seco e úmido. Teste de *Tukey* foi feito para comparar os períodos seco e úmido dentro de uma mesma área (letras minúsculas) e Agricultura vs. Floresta adjacente para um mesmo período sazonal (letras maiúsculas)

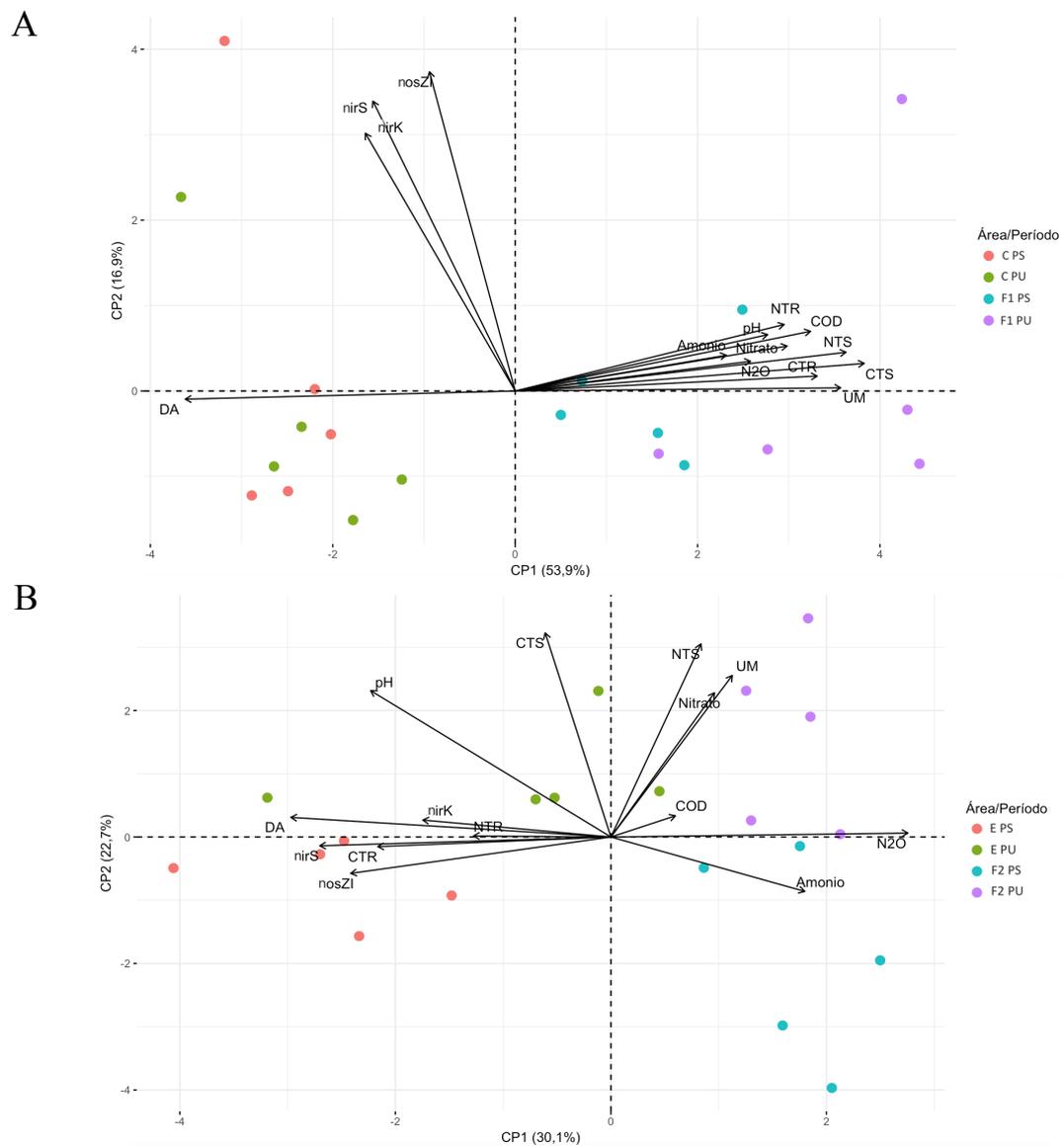
O fator 'sazonalidade' teve forte influência nas emissões de N<sub>2</sub>O nas áreas de 'Citros' e 'Floresta 1', gerando resultados significativos ( $P < 0,05$ ) nas comparações entre mesma área nos diferentes períodos. Além disso, foi possível observar significância nas emissões entre as áreas nativas e áreas cultivadas, 'Floresta 1' vs. 'Citros' e 'Floresta 2' vs. 'Eucalipto'. As maiores emissões de N<sub>2</sub>O nas áreas de florestas podem ser explicadas pela espessa camada de serapilheira encontrada nessas áreas, a qual aumenta a retenção de vapor d'água (KRAVCHENKO, et al., 2017). Da mesma forma ocorre quando se compara os valores de emissões de N<sub>2</sub>O entre o período seco e o período úmido, tendo sido revelado aumento nessa emissão de N<sub>2</sub>O em todas as áreas de estudo. A área de 'Floresta 1' mostrou maior emissão comparada a área de cultivo de 'Citros', assim como a área de 'Floresta 2' e 'Eucalipto'.

Segundo Taketani et al. (2017), a umidade é um fator importante nas mudanças entre as comunidades microbianas do solo, tendo a diminuição de nutrientes durante o período seco

e, conseqüentemente, a seleção entre as comunidades microbianas durante essa fase. Com o aumento na umidade, comunidades mais sensíveis tem acesso aos nutrientes, agora com maior disponibilidade devido ao transporte dos mesmos pela água. Ademais, sendo o processo de desnitrificação anaeróbico, este é potencializado sob elevada umidade, devido, também, à diminuição na concentração de oxigênio no solo (CLOUGH, et al., 2016). Logo, a umidade possui relação não somente com a abundância de comunidades de microrganismos do solo, mas também com a disponibilidade de O<sub>2</sub> para os processos bioquímicos da desnitrificação, sendo um fator considerável nas emissões de N<sub>2</sub>O.

Além da umidade, o teor de nitrogênio (N) no solo apresenta importante papel nas emissões de N<sub>2</sub>O, principalmente na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (CERRI, et al., 2006; CARMO et al., 2005). Dessa forma, a relação C:N tem influência direta nas emissões de N<sub>2</sub>O, uma vez que a disponibilidade de C e N é essencial para ocorrer o processo de desnitrificação. Outro fator a ser considerado é o pH, Chen et al. (2014) mostraram correlação positiva entre o pH e as emissões de N<sub>2</sub>O e, também, entre pH e a porcentagem de bactérias desnitrificantes. Segundo Harter et al. (2014), a emissão de N<sub>2</sub>O aumenta em valores de pH mais baixos (condição de acidez), devido a inibição dos microrganismos redutores de N<sub>2</sub>O. Embora não haja correlação significativa entre os fluxos de campo e o pH dos solos, é possível observar que a área de ‘Floresta 2’ (área de maior emissão de N<sub>2</sub>O) é o local que apresentou o menor pH).

A análise de componentes principais (ACP) foi aplicada aos fluxos de N<sub>2</sub>O obtidos em campo (Figura 10A e 10B), fatores químicos e físicos e número de cópias dos genes *nirK/S* e *nosZ* determinados a partir das amostras de solo coletadas em campo, sendo a figura 10A da área de ‘Citros’ e ‘Floresta 1’, e 10B as áreas de ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’. A ACP A revelou relação positiva significativa ( $P < 0,05$ ) entre COD, C e N totais do solo e dos resíduos vegetais, bem como entre os fluxos de N<sub>2</sub>O e tais fatores químicos do solo e dos resíduos vegetais. A separação por uso da terra é evidente na ACP 10A, tendo a APC 10B apresentado divisão das áreas de acordo com a sazonalidade. Por sua vez, a abundância dos genes *nirK/S* e *nosZ* revelou relação negativa com os fatores químicos mencionados anteriormente e positiva com a densidade do solo (Figura 10).

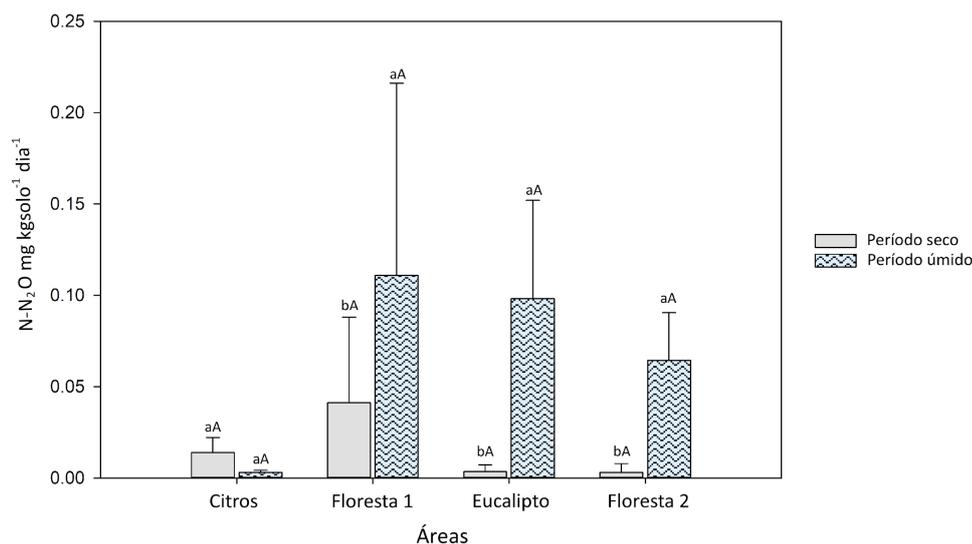


**Figura 10.** Análise de componente principal (ACP) dos fluxos de  $N_2O$  de campo, fatores químicos e físicos dos solos e número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* obtidos a partir das amostras de solo coletadas em campo. (A) ACP de ‘Citros’ e ‘Floresta 1’. C PS: Citros no período seco, C PU: Citros no período úmido; F1 PS: Floresta 1 no período seco; F1 PU: Floresta 1 no período úmido; (B) ACP de ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’. E PS: Eucalipto no período seco, E PU: Eucalipto no período úmido; F2 PS: Floresta 2 no período seco; F2 PU: Floresta 2 no período úmido. COD = Carbono orgânico dissolvido; CTS = Carbono total do solo; CTR = Carbono total do resíduo; DA = Densidade do solo; NTS = Nitrogênio total do solo; NTR = Nitrogênio total do resíduo; UM = Umidade do solo

## 6.2.2 Ensaios de incubação em microcosmos

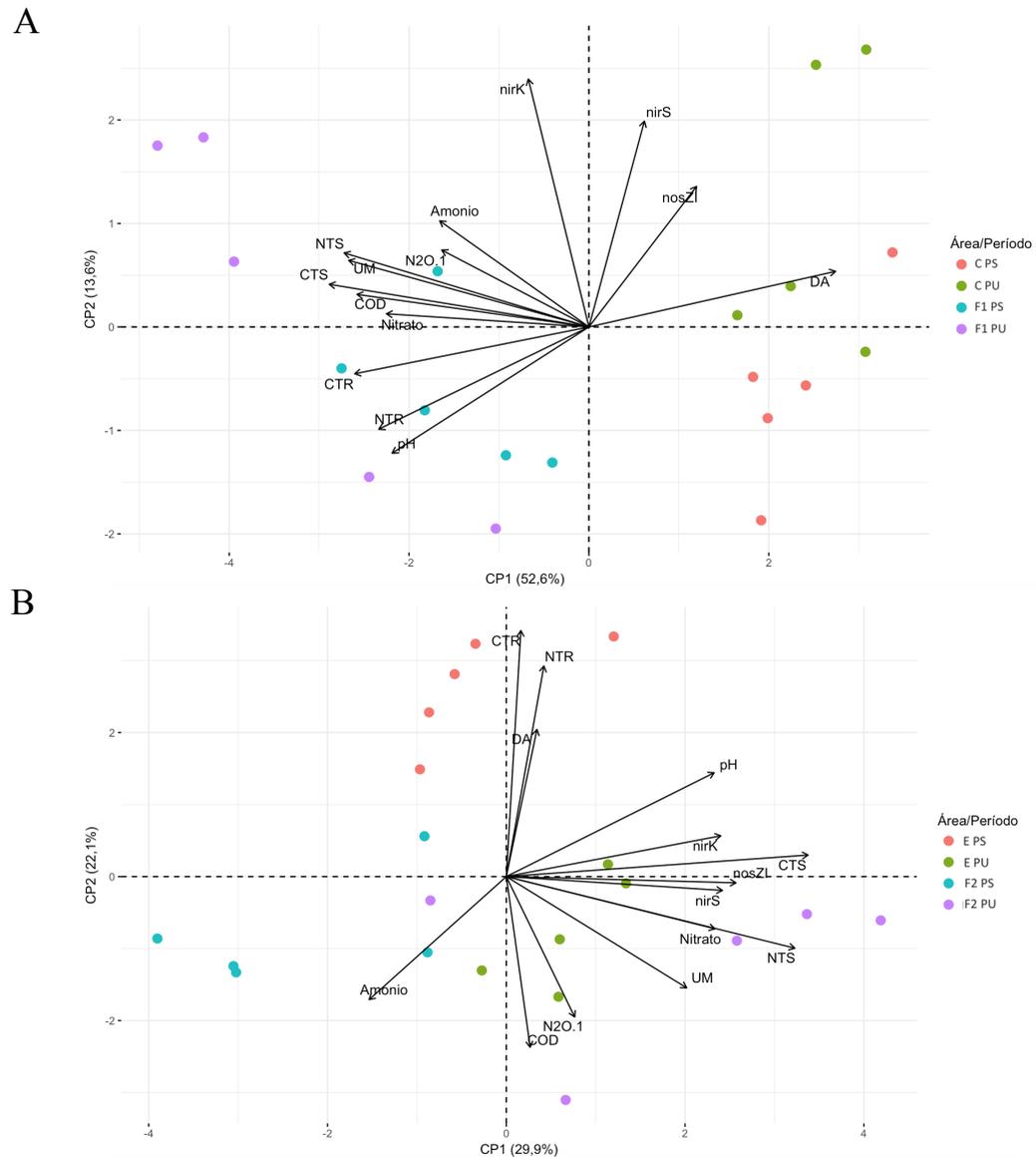
De acordo com os fluxos de  $N_2O$  determinados a partir do experimento em microcosmos com solo a 70% da CC, as diferenças nas emissões a partir de solos coletados nas áreas sob agricultura e floresta diminuíram em relação aos fluxos de campo. Isso aponta a umidade do solo como um dos fatores que ajuda a explicar as diferenças observadas nas

emissões de  $N_2O$  determinadas em campo (Figura 11). Considerando a umidade do solo como fator importante no controle das emissões de  $N_2O$ , a contribuição dos resíduos vegetais na superfície do solo para tais emissões passa a ser evidenciada devido a retenção da umidade e consequente papel de “hot spot” na produção desse gás (KRAVCHENKO, et al., 2017). Em consequência a esses ambientes anaeróbios, os microrganismos desnitrificantes utilizam o carbono orgânico como doador de elétrons durante o processo de desnitrificação, ao invés de óxidos de nitrogênio (WU, et al., 2009), o que torna o COD, também, um importante fator na produção de  $N_2O$ . Apesar da umidade mostrar-se como um fator importante para as emissões de  $N_2O$ , observa-se que mesmo mediante normalização do teor de água no solo (70 % da CC), as diferenças nas emissões entre os solos coletados no período seco e período úmido é significativa, com exceção do solo da área ‘Citros’ (Figura 11). Embora tendo apresentado comportamento oposto ao solo das demais áreas, a comparação entre a emissão de  $N_2O$  a partir do solo da área ‘Citros’ em período seco e úmido não revelou diferenças significativas, em oposição às áreas ‘Floresta 1’, ‘Floresta 2’ e ‘Eucalipto’, que mostraram efeito sazonal para a emissão de  $N_2O$ . Tal observação corrobora observações prévias (TAKETANI, et al., 2017; CLOUGH, et al., 2016) que mostraram a umidade como fator importante na emissão de  $N_2O$ . Além disso, a estrutura do solo também pode ter relação com essa diminuição dos fluxos, uma vez que esse solo sofre alterações no transporte e montagem do experimento. Sendo o microcosmo um ambiente livre de vegetação, a textura do solo, principalmente o teor de argila, também pode assumir o papel principal na retenção de água e controle dessa umidade (WANG et al. 2009).



**Figura 11.** Média dos fluxos de óxido nitroso em experimento de microcosmos com solos sob citros, eucalipto e vegetação florestal adjacente às áreas agrícolas em período seco e úmido a umidade de 70 % da CC. Teste de Tukey foi feito para comparar os períodos seco e úmido dentro de uma mesma área (letras minúsculas) e Agricultura vs. Floresta para um mesmo período sazonal (letras maiúsculas)

Dentre as comparações entre áreas nativas e áreas cultivadas, não foi possível observar resultados significativos entre os fluxos. Por outro lado, nas comparações entre fluxos e fatores químicos, é claro que o fator “área”, e consequente tipo de cobertura do solo, possui influência nas diferenças entre os fluxos nos diferentes locais de coleta. Dessa forma, os fatores químicos dos solos e serapilheira advindos com as amostras podem possuir, também, influência nas emissões de N<sub>2</sub>O nos experimentos de microcosmos. Na ACP A (Figura 12A), o solo da área ‘Floresta 1’ diferiu de ‘Citros’ no componente principal 1 assim como na ACP de campo (Figura 10A). Um padrão similar de distribuição pode ser observado na ACP B (Figura 12B), na qual os dados da ‘Floresta 2’ e o ‘Eucalipto’ estão ilustrados. As correlações positivas entre os fluxos de N<sub>2</sub>O e os fatores químicos e físicos é explícita na figura 12A, na qual o número de cópia dos genes possuem correlações opostas aos demais valores. Nesta, o eixo 1 foi capaz de explicar 52,6% da distribuição dos dados no espaço da ordenação, enquanto apenas 13,6% dessa distribuição foi explicada pelo eixo 2. A soma da explicabilidade dos dois eixos plotados na ordenação foi de 66,2% da variação dos parâmetros mensurados. Uma maior correlação entre os fluxos de N<sub>2</sub>O e o COD é observada na ACP B (Figura 12B), na qual o número de cópias dos genes apresentou correlação positiva com os fatores químicos e físicos do solo. A ACP do ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’ teve o eixo 1 com explicabilidade de 29,9%, seguido pelo eixo 2 com 22,1%, tendo, então, um total de 52% da variação dos parâmetros mensurados.



**Figura 12.** Análise de componente principal (ACP) dos fluxos de  $N_2O$  obtidos no experimento de incubação em microcosmos, fatores químicos e físicos dos solos e número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* obtidos a partir das amostras de solo incubadas em microcosmos. (A) ACP de ‘Citros’ e ‘Floresta 1’. C PS: Citros no período seco, C PU: Citros no período úmido; F1 PS: Floresta 1 no período seco; F1 PU: Floresta 1 no período úmido; (B) ACP de ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’. E PS: Eucalipto no período seco, E PU: Eucalipto no período úmido; F2 PS: Floresta 2 no período seco; F2 PU: Floresta 2 no período úmido. COD = Carbono orgânico dissolvido; CTS = Carbono total do solo; CTR = Carbono total do resíduo; DA = Densidade do solo; NTS = Nitrogênio total do solo; NTR = Nitrogênio total do resíduo; UM = Umidade do solo

Com base nos resultados apresentados, a *hipótese I* é aceita, uma vez que os fluxos de  $N_2O$  a partir dos solos das áreas agrícolas e florestais diferiram significativamente quanto as emissões determinadas em campo e microcosmos, com os fatores químicos COD, C e N totais

do solo e nos resíduos vegetais e pH do solo diretamente relacionados às emissões. Os fatores físicos apresentaram relações significativas com os fatores químicos do solo, mas não com os fluxos de N<sub>2</sub>O diretamente.

A seguir serão apresentados os resultados relativos à avaliação da *Hipótese II* juntamente com a discussão dos mesmos.

### 6.3 NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES *nirK*, *nirS* E *nosZ*

A determinação do número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* foi feita a partir das 80 amostras de DNA genômico do solo coletadas nas quatro diferentes áreas de estudo em período seco e úmido e provenientes do experimento em microcosmo (Tabela 4).

Tanto nas amostras provenientes de campo quanto dos ensaios de incubação feitos em microcosmos, o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* não diferiu estatisticamente entre os solos sob os diferentes usos em ambos os períodos sazonais, com exceção do solo da área ‘Eucalipto’ e ‘Floresta 2’ no ensaio em microcosmo no período úmido. Porém, foi possível observar maior abundância dos referidos genes nas amostras coletadas em campo e incubadas em microcosmo no período úmido em comparação com aquelas coletadas no período seco. Essa relação por ser explicada pelo padrão entre os genes desnitrificantes, a concentração de COD e a umidade do solo. A textura do solo pode ter comprometido as variações na microbiota, uma vez que tem influencia no microclima do solo. Tal fator corrobora com Burns et al. (2015), o qual mostra a argila correlacionando positivamente com a microbiota local.

Apesar disso, com base no *heatmap* foi possível observar relações entre os genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* e os fatores físicos e químicos do solo (Figura 13). Liu et al. (2013) também mostraram correlações entre a abundância de genes funcionais com os fatores químicos do solo, como evidenciado nesse trabalho.

**Tabela 4.** Abundância absoluta dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* determinada por PCR Quantitativo em Tempo Real a partir de amostras de solo coletadas em campo e incubadas em microcosmos em período seco e úmido

Genes	Período seco				Período úmido			
	Citros	Floresta 1	Eucalipto	Floresta 2	Citros	Floresta 1	Eucalipto	Floresta 2
----- <i>Campo</i> -----								
<i>nirK</i>	34,1 <sup>a</sup> ±2,0 <sup>§</sup>	28,1bA±2,3	39,6bA ±11,1	19,1bA±7,1	40,2aA±1,3	34,4aA±3,0	148,0aA±27,1	30,6aA±3,2
<i>nirS</i>	0,05aA±0,03	0,05aA±0,005	0,5aA ±0,2	0,2aA±0,1	0,1aA±0,03	0,01aA±0,004	0,4 aA±0,2	0,2aA±0,1
<i>nosZ</i>	5,1bA±1,4	6,8bA±3,3	37,0bA±14,7	24,0bA ±9,2	10,1aA±1,1	0,3aA±0,1	116,0aA±18,4	46,9aA±9,8
----- <i>Incubação em microcosmo</i> -----								
<i>nirK</i>	21,3aA±3,5	14,0bA±1,7	32,9bA±2,1	30,5bA ±4,4	20,8aA±3,3	31,5aA±7,2	42,3aA±3,6	61,7aA±17,9
<i>nirS</i>	0,03aA±0,01	0,1aA±0,	0,2 aA±0,05	0,2aA ±0,1	0,1aA±0	0,04aA±0	0,2aA±0,05	0,4aA±0,2
<i>nosZ</i>	28,0aA±3,5	8,2bA±1,9	32,7bA±8,2	34,0bA ±5,5	18,3bA±2,6	3,2aA±2,6	67,3aA±17,7	79,9aA±9,3

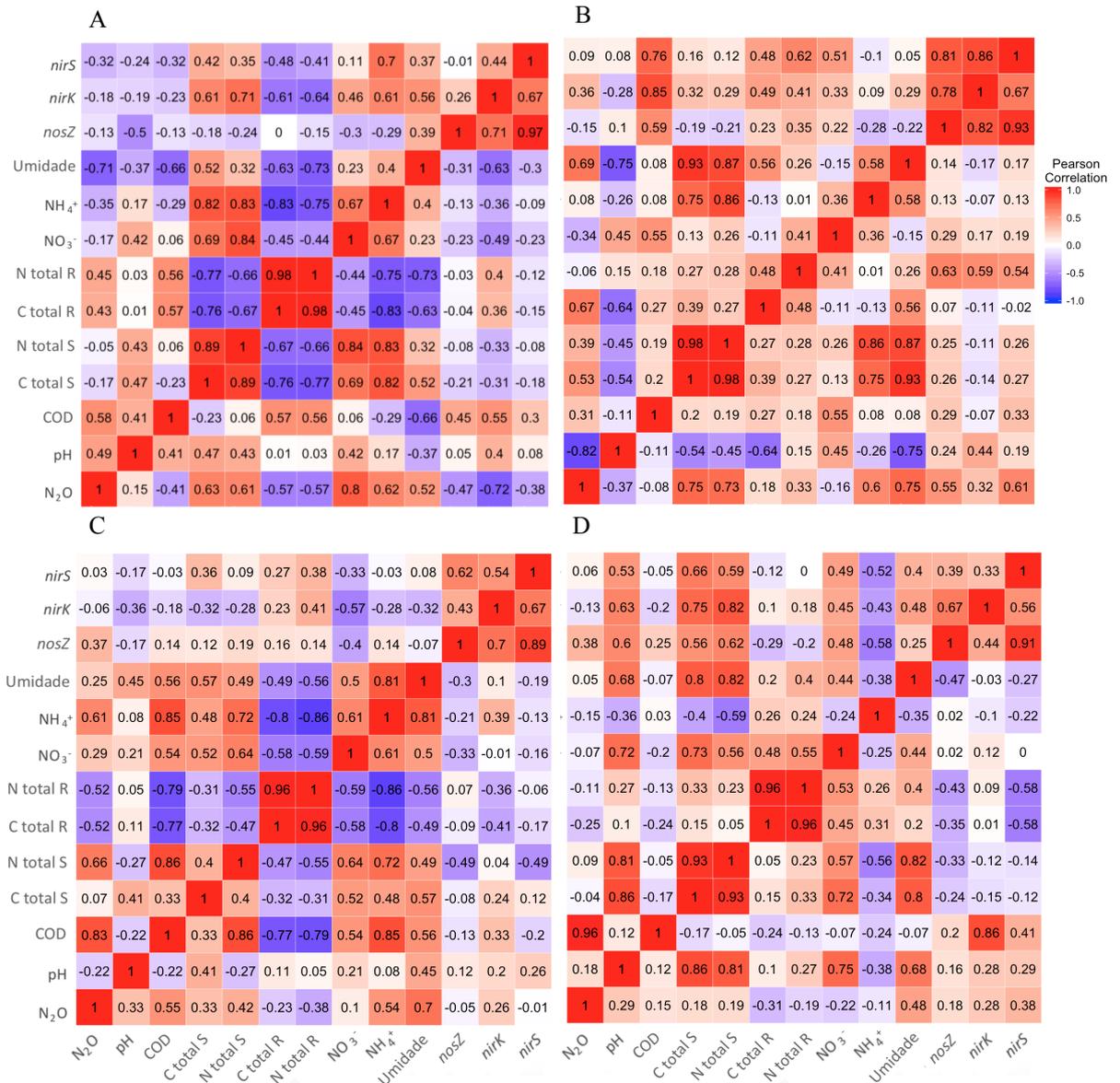
Os valores estão expressos em 10<sup>5</sup> cópias de genes por grama de solo

<sup>a</sup>Média calculada a partir de cinco repetições

<sup>§</sup>Desvio padrão calculado a partir de cinco repetições

Teste *Tukey* foi feito separadamente para comparar períodos seco e úmido em uma mesma área de amostragem (letra minúscula), e floresta vs. área agrícola adjacente em um mesmo período (letras maiúsculas)

Valores com letras iguais, minúsculas ou maiúsculas, não são significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas



**Figura 13.** Heatmap de correlação de Pearson, o qual foi feito para testar as relações entre fluxos de N<sub>2</sub>O, fatores químicos, físicos e moleculares. Dados de campo está representado pelo triângulo inferior e dados de microcosmos estão representados pelo triângulo superior. (A) Dados da área de ‘Citros’, campo e microcosmo; (B) Dados da ‘Floresta 1’, campo e microcosmo; (C) Dados da área de ‘Eucalipto’, campo e microcosmo; (D) Dados da ‘Floresta 2’, campo e microcosmo. R = Resíduo vegetal; S = Solo

Correlações entre o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* determinado a partir das amostras provenientes do experimento em microcosmo e os fatores físicos e químicos do solo revelaram correlações negativas nas áreas de cultivo, ‘Citros’ e ‘Eucalipto’ (Figura 13A e 13C, triângulo superior). Essa tendência também é mostrada a partir das amostras de campo (Figura 13A e 13C, triângulo inferior). Tais resultados enfatizam que os fatores químicos possuem relação com a estrutura das comunidades de microrganismos do solo, podendo ser agentes estimulantes ou inibidores de determinados grupos (BURNS, et al., 2015).

Com base nesses resultados, a *hipótese II* foi parcialmente aceita, com maior abundância dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* no solo durante o período úmido. Embora não tenha sido observada diferença significativa no número de cópias desses genes entre as áreas agrícolas e florestais, foi revelada relação entre a abundância dos referidos genes e fatores físico-químicos como a densidade do solo, pH, carbono e nitrogênio totais dos resíduos e dos solos e nitrato (Figuras 10B, 11A e 11B).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sazonalidade foi o fator de maior influência nas emissões de  $N_2O$  e, também, na abundância de bactéria desnitrificante em solos cultivados por citros e eucalipto. Tal influência deu-se por meio das características químicas dos resíduos vegetais e físico-químicas dos solos, especialmente aquelas relacionadas com a concentração de COD e umidade do solo. A hipótese de que fluxos de  $N_2O$  obtidos de solos cultivados com citros e eucalipto e florestas adjacentes variam em parte pela sazonalidade e características físico-químicas dos solos foi aceita com base na maior emissão semanal de  $N_2O$  em todas as áreas de estudo no período úmido. O aumento dessa emissão no período úmido pode ser explicado pelo aumento dos teores de C e N totais do solo e da umidade. Por outro lado, a hipótese de que a abundância de bactérias desnitrificantes diferem em solos cultivados com citros e eucalipto e em solos de florestas nativas foi parcialmente aceita com base na maior abundância dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* no período úmido em comparação com o período seco. Contudo, não foi revelada significância estatística nas comparações entre a abundância dos referidos genes em solos cultivados e suas respectivas áreas florestais adjacentes. A maior abundância dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* no período úmido em comparação com o período seco pode ser explicado pelo aumento da concentração de nitrato e amônio nos solos durante o período úmido, e a forte relação desses fatores com os demais fatores físico-químicos. Os resultados apontam a necessidade de maiores investigações sobre a composição da microbiota desnitrificante para a identificação dos principais micro-organismos desnitrificantes responsáveis pelo aumento na emissão de  $N_2O$  em solos cultivados por citros e eucalipto no período úmido da região.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, L. et al. Transferable denitrification capability of *Thermus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., v. 80, n. 1, p. 19-28, 2014.
- ARAÚJO, A.S.F. DE.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. Biosci. J., v. 23, p. 66-75, 2007.
- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, v. 17, p. 478-486, 2012.
- BISSETT, A. et al. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. Applied Soil Ecology, v. 51, p. 66-78, 2011.
- BONANOMI, G. et al. Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions. Soil Biology & Biochemistry, v. 103, p. 327-336, 2016.
- BORTOLI, M. et al. Emissão de óxido nitroso nos processos de remoção biológica de nitrogênio de efluentes. Eng. Sanit. Ambient., v. 17, n. 1, p. 1-6, 2012.
- BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl Environ Microbio., v. 64, n. 10, p. 3769-3775, 1998.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Mercado Interno. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comunicação Nacional Inicial do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima. Coordenação-Geral de Mudanças Globais de Clima. Brasília, DF, 2004. 74 p.
- BUENO, E. et al. Anoxic growth of *Ensifer meliloti* 1021 by N<sub>2</sub>O-reduction, a potential mitigation strategy. Frontiers in Microbiology, v. 6, n. 537, 2015.
- BURGHARDT, W.; SCHNEIDER, T. Bulk density and content, density and stock of carbon, nitrogen and heavy metals in vegetable patches and lawns of allotments gardens in the northwestern Ruhr area, Germany. J Soils Sediments, v. 18, p. 407-417, 2018.
- BURNS, K.N. et al. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. Soil Biology & Biochemistry, v. 91, p. 232-247, 2015.
- BUZINARO, T.N. Qualidade microbiológica do solo sob citrus em comparação com outros ecossistemas e sob adubação verde. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Instituto Agronômico, 2009. 77 p.

- CARMO, J.B. et al. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N<sub>2</sub>O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. R. Bras. Ci. Solo, v. 29, p. 735- 746, 2005.
- CAVARARO, R. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Rio de Janeiro: IBGE, v. 29, p. 1-56, 2014.
- CERRI, C.E.P. et al. Interrelationships among soil total C and N, microbial biomass, trace gas fluxes, and internal N-Cycling in soils under pasture of the Amazon region. Journal of Sustainable Agriculture, v. 27, p. 45-69, 2006.
- CHEN, H. et al. The significant contribution of fungi to soil N<sub>2</sub>O production across diverse ecosystems. Applied Soil Ecology, v. 73, p. 70-77, 2014.
- CLARK, I. M. et al. Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., v. 367, p. 1235-44, 2012.
- CLOUGH, T.J. et al. Influence of soil moisture on codenitrification fluxes from a urea-affected pasture soil. Scientific Reports, v. 7, Article number: 2185, 2017.
- DAVIDSON, E.A. et al. Testing a conceptual model of soil emissions of nitrous and nitric oxides. BioScience, v. 50, n. 8, p. 667-680, 2000.
- DURRER, A. et al. The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. Applied Soil Ecology, v. 110, p. 12-20, 2017.
- EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Informações Tecnológicas, 2ed., Brasília, 2009.
- EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2ed., Rio de Janeiro, 1997.
- FIERER, N. et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. The ISME Journal, v. 6, p. 1007-1017, 2012.
- GAMBLE, T.N. et al. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Applied and Environmental Microbiology, v. 33, n. 4, p. 926-939, 1977.
- GARCÍA-ORENES, F. et al. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a Mediterranean agro-ecosystem. PLoS ONE, v. 8, p. 1-9, 2013.
- GOLCHIN, A. et al. Soil structure and carbon cycling. Australian Journal of Soil Research, v. 32, p. 1043-1068, 1994.

- HARTER, J. et al. Linking N<sub>2</sub>O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. The ISME Journal, v. 8, p. 660-674, 2014.
- HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. J Microbiol Methods, v. 59, n. 3, p. 327-335, 2004
- HENRY, S. et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Appl Environ Microbiol., v. 72, n. 8, p. 5181-5189, 2006.
- HINK, L. et al. Archaea produce lower yields of N<sub>2</sub>O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. Environmental Microbiology, v. 19, n. 12, p. 4829-4937, 2017.
- IPCC. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp., 2014.
- JONES, C.M. et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. ISME J, v. 7, n. 2, p. 417-426, 2013.
- KANDELER, E. et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, p. 5957-5962, 2006.
- KLEMEDTSSON, L. et al. Soil denitrification in three cropping systems characterized by differences in nitrogen and carbon supply. II. Water and NO<sub>3</sub> effects on the denitrification process. Plant Soil, v. 138, p. 273–286, 1991.
- KRAVCHENKO, A.N. et al. Hotspots of soil N<sub>2</sub>O emission enhanced through water absorption by plant residue. Nature Geoscience, v. 10, p. 496- 500, 2017.
- KROM, M.D. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. Analyst, v. 105, p. 305-316, 1980.
- KURAMAE, E.E. et al. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. FEMS Microbiol. Ecol., v. 79, p. 12–24, 2011.
- LING, N. et al. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis. Soil Biology and Biochemistry, v. 99, p. 137-149, 2016.
- LIU, X. et al. Soil environmental factors rather than denitrification gene abundance control N<sub>2</sub>O fluxes in a wet sclerophyll forest with different burning frequency. Soil Biology & Biochemistry, v. 57, p. 292-300, 2013.

- MARQUES, J.D.O. et al. Variações do carbono orgânico dissolvido e de atributos físicos do solo sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Central. R. Bras. Ci. Solo, v. 36, p. 613-622, 2012.
- MORTON, D.C. et al. Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. Proc Natl Acad Sci., v. 103, p. 14637–14641, 2006.
- NAVARRETE, A.A. et al. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. Antonie van Leeuwenhoek, v. 108, p. 741-752, 2015.
- NAVARRETE, A.A. et al. Land-use systems affect archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soils. Rev. Bras. De Cienc. Solo, v. 35, p. 1527–1540, 2011.
- NETO, M.S. et al. Mineralização e desnitrificação do nitrogênio no solo sob sistema plantio direto. Bragantia, v. 69, n. 4, p. 923-936, 2010.
- NEVES, M.F. et al. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010.
- NORMAN, R.J. et al. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry. Soil Science Society of America Journal, v. 49, n. 5, p.1182-1185, 1985.
- POTTHAST, K.; HAMER, U.; MAKESCHIN, F. Land-use change in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador affects soil microorganisms and nutrient cycling. Biogeochemistry, v. 111, p. 151-167, 2012.
- QIN, Y. et al. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. Biotechnology Advances, v. 34, p. 1245-1259, 2016.
- REICHARDT, K. Capacidade de campo. Campinas, R. Bras. Ci. Solo, n.12, p. 211-216, 1988.
- RODRIGUES, J.L.M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 110, p. 988–993, 2013.
- SANCHES, A.C. et al. Impacto do cultivo de citros em propriedades químicas, densidade do solo e atividade microbiana de um podzólico vermelho-amarelo. R Bras Ci Solo, v. 23, p. 91-99, 1999.
- SCHIMIGUEL, R. et al. Estabilidade de agregados do solo devido a sistemas de cultivo. Synergismus scyentifica UTFPR, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014.
- STROOBANTS, A. et al. Diversity of bacterial communities in a profile of a winter wheat field: Known and unknown members. Microb Ecol., v. 68, p. 822-833, 2014.
- TAKETANI, R.G. et al. Dry season constrains bacterial phylogenetic diversity in a semi-arid rhizosphere system. Microb Ecol., v. 73, p. 153-161, 2017.

THROBACK, I.N. et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiol Ecol., v. 49, n. 3, p. 401-417, 2004.

TIAN, H. et al. The terrestrial biosphere as a net source of greenhouse gases to the atmosphere. Nature, v. 531, p. 225-232, 2016.

TIEDJE, J.M. et al. Denitrification: ecological niches, competition and survival. Antonie von Leeuwenhoek, v. 48, p. 569–583, 1982.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 56, p. 782-787, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10a edição, Santana: ARTMED, 967 p., 2012.

VENTER, Z.S.; JACOBS, K.; HAWKINS, H.J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. Journal of Soil Ecology, v. 59, p. 215-223, 2016.

VITAL, M.H.F. Impacto ambiental de florestas de eucalipto. Revista do BNDS, v. 14, p. 235-276, 2007.

WAN, X. et al. Soil C:N ratio is the major determinant of soil microbial community structure in subtropical coniferous and broadleaf forest plantations. Plant Soil, v. 387, p. 103-116, 2015.

WANG, Y. et al. Responses of denitrifying bacterial communities to short-term waterlogging of soils. Scientific Reports, v. 7, n. 803, 2017.

WANG, T.E. et al. On the role of groundwater and soil texture in the regional water balance: An investigation of the Nebraska Sand Hills, USA. Water Resour. Res., v. 45, n. 10, 2009.

WEITZ, A.M. et al. N<sub>2</sub>O emissions from humid tropical agricultural soils: effects of soil moisture, texture and nitrogen availability. Soil Biology & Biochemistry, v. 33, p. 1077-1093, 2001.

WU, J. et al. Impact of COD/N ratio on nitrous oxide emission from microcosm wetlands and their performance in removing nitrogen from wastewater. Bioresource Technology, v. 100, p. 2910-2917, 2009.

ZHU, S.; VIVANCOB, J.M.; MANTER, D.K. Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. Applied Soil Ecology, v. 107, p. 324-333, 2016.

ZILLI, J.E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZULIANI, D.Q. et al. Balanço geoquímico em uma microbacia hidrográfica sob plantio de eucalipto. Cad Ciênc Agrá., v. 8, p. 28-37, 2016.

ZSCHORNACK, T. et al. Impacto de plantas de cobertura e da drenagem do solo nas emissões de CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O sob cultivo de arroz irrigado. Pesq. Agropec. Bras., v. 51, n. 9, p. 1163-1171, 2016.