

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**COMUNIDADE BACTERIANA NITRIFICANTE DO SOLO CULTIVADO  
COM MILHO, FORRAGEIRAS E EM SISTEMA CONSORCIADO NO  
CERRADO**

**RAYANE JEIZEBEL COSTA ALVES**

**BRASÍLIA, DF**

**DEZEMBRO DE 2017**

**RAYANE JEIZEBEL COSTA ALVES**

**COMUNIDADE BACTERIANA NITRIFICANTE DO SOLO CULTIVADO COM  
MILHO, FORRAGEIRAS E EM SISTEMA CONSORCIADO NO CERRADO**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia  
e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília,  
como parte das exigências do curso de Graduação  
em Agronomia, para a obtenção do título de  
Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. **ALESSANDRA  
MONTEIRO DE PAULA**

**BRASÍLIA, DF**

**DEZEMBRO DE 2017**

**RAYANE JEIZABEL COSTA ALVES**

**COMUNIDADE BACTERIANA NITRIFICANTE DO SOLO CULTIVADO COM  
MILHO, FORRAGEIRAS E EM SISTEMA CONSORCIADO NO CERRADO**

Monografia apresentada como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Doutora, Alessandra Monteiro de Paula

**APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 13/12/2017**

---

Doutora Alessandra Monteiro de Paula  
Universidade de Brasília – UnB  
Orientadora

---

Doutora Maria Lucrecia Gerosa Ramos  
Universidade de Brasília – UnB

---

Msc. Daniel Fernando Salas Méndez  
Universidade de Brasília – UnB

## FICHA CATALOGRÁFICA

ALVES, Rayane Jeizebel Costa.

“Comunidade bacteriana nitrificante do solo cultivado com milho, forrageiras e em sistema consorciado no Cerrado”/Orientação; Alessandra Monteiro de Paula. Brasília, 2017 - 69 p.

Monografia de graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, R.J.C. Comunidade bacteriana nitrificante do solo cultivado com milho, forrageiras e em sistema consorciado no Cerrado. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV, Universidade de Brasília – UnB, 2017, 69 p. Trabalho de conclusão de curso.

## CESSÃO DE DIREITOS

**Nome do autor:** Rayane Jeizebel Costa Alves

**Título da monografia de conclusão de curso:** Comunidade bacteriana nitrificante do solo cultivado com milho, forrageiras e em sistema consorciado no Cerrado.

**Grau:** 3º      **Ano:** 2017.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

RAYANE JEIZEBEL COSTA ALVES.

CPF: 047.293.211-03

EQNM 6/8 Bloco F lote 02, Ceilândia Norte.

CEP: 72210-536 Brasília-DF, Brasil.

Telefone: (61) 98165-0422

E-mail: rayanejca1993@gmail.com

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai celestial, Deus!  
A minha mãe, Geanny Alves,  
Ao meu pai, Fabio Alves,  
E a minha irmã Nayara Costa,  
por todo amor e apoio durante essa trajetória.*

***Determinando tu algum negócio, ser-te-à firme, e a luz brilhará em teus caminhos (Jó, 22:28)***

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao meu Pai celestial, que abriu essa porta em minha vida, e me guiou durante toda essa jornada. Não permitiu a minha desistência, e me deu forças quando eu já não mais as tinha.

Agradeço ao meu pai, Fábio, que mesmo em meio a todas as dificuldades emocionais e financeiras, permaneceu firme, e me apoiou até o último momento dessa trajetória, sendo o homem e pai que eu esperava que fosse.

A minha mãe, Geanny, por todo amor, apoio e incentivo, mesmo em meio a momentos de tribulação e das dificuldades na conclusão de seu curso, além de sempre nos incentivar a buscar uma mudança de vida por meio da educação, e também por jamais desistir de nossa família.

A minha irmã, Nayara, que foi e é a melhor irmã que qualquer pessoa poderia ter, com um coração enorme, sempre me incentivando, representando uma figura de perseverança, trabalho duro e cuidado ao próximo.

A minha orientadora, Alessandra Monteiro de Paula, por confiar no meu potencial, pela paciência, pelo compartilhamento de seus conhecimentos durante toda a iniciação científica até conclusão deste trabalho.

Ao professor Helson Mario Martins do Vale, por disponibilizar o laboratório de Fitopatologia Molecular para nossas análises, e também pelo conhecimento e materiais compartilhados.

As incríveis e inteligentíssimas “quase” Doutoradas: Geisiany e Catharine, pela ajuda e ensinamento das “temidas” técnicas moleculares, pela disponibilidade em sempre nos ajudar e pelo carinho e respeito.

Aos meus amigos de Vida (Fernanda, Elanny, Marcos, Thereza, entre outros), pela compreensão da minha ausência durante a conclusão desse curso, e pelo apoio emocional.

Ao meu Avô (Osvaldo), minha avó (Maria Lucía), minha avó paterna Roberta, aos meus tios, tias, e primos pelo apoio e incentivo.

A minha prima Mayra, por me auxiliar na tradução do resumo, Rs, além do incentivo e carinho.

A minha irmã Fabiana, e aos meus sobrinhos.

Aos meus amigos conquistados durante essa caminhada na UnB (Gabriel, Nathalia, Paloma, Flavia, Isabelle, Lemerson, Vanessa, Giovanna) pelo apoio, carinho, amizade e paciência. Por todo o estudo, material, alegrias e sofrimentos compartilhados durante essa jornada acadêmica.

## RESUMO

### COMUNIDADE BACTERIANA NITRIFICANTE DO SOLO CULTIVADO COM MILHO, FORRAGEIRAS E EM SISTEMA CONSORCIADO NO CERRADO

Sabe-se que microrganismos como fungos e bactérias participam de processos chave para ciclagem de nutrientes, estabelecendo uma relação fundamental no sistema solo-planta-atmosfera. A comunidade bacteriana do solo é influenciada por vários fatores ambientais, destacando-se, por exemplo, o tipo de cobertura vegetal e o manejo do solo. Tendo consciência da importância dos mesmos para a manutenção da qualidade do solo e o aumento de produtividade das culturas, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos diferentes sistemas de manejo do solo, consorciado e em monocultivo, na comunidade de arqueas oxidantes de amônio utilizando técnicas moleculares (PCR-DGGE). Os sistemas de manejo empregados foram: Milho (*Zea mays*) em monocultivo; Milho consorciado com *Panicum maximum* cv. Aruana; Milho consorciado *Urochloa humidicola*, pastagem *Urochloa humidicola*; pastagem *Panicum maximum* cv. Aruana, com três repetições cada, e uma área de referência do Cerrado (com duas repetições) nativo localizado próximo ao experimento. Observou-se que a *Urochloa humidicola* influenciou a comunidade de arqueas do solo tanto em monocultivo, quanto sob consórcio com o milho, e a área sob milho em monocultivo pode ter modificado essa comunidade em função da aplicação de fertilizantes químicos. As áreas sob consórcio de milho com *Panicum maximum* cv. Aruana, apenas com *Panicum maximum* cv. Aruana e as áreas de Cerrado apresentaram baixa similaridade, o que dificultou relacionar a estrutura da comunidade de arqueas oxidantes de amônio com o manejo empregado na área.

**Palavras-chave:** Integração lavoura-pecuária, Bactérias nitrificantes, Cultivos consorciados, Arqueas, Técnicas moleculares.

## ABSTRACT

### BACTERIAL NITRIFICANT SOIL COMMUNITY CULTIVATED WITH CORN, FORAGE AND CONSORTIATED SYSTEM IN CERRADO

We know microorganisms, for example fungi and bacteria has the participation in main process for cycling about nutrients, establishing a crucial relation in the soil-plant-atmosphere system. The soil bacterial community is influenced by several environment factors, for example, kind of crops coverage and the soil management. Knowing the importance of those factors about maintenance of soil quality as well as the increase of agricultural productivity, the subject this work was to evaluate the influence of different soils management systems, intercropping and monocropping, in communities of ammonia oxidizing archaea, using molecular techniques like PCR-DGGE. The management systems applied were: maize monocropping, maize intercropping with *P. maximum* cv. Aruana; maize intercropping with *U. humidicola*, *U.humidicola* pasture and *P.maximum* cv. Aruana pasture, using three replications each one, and one area of native Cerrado (using two r replications), localized next to the experiment. It was observed that *U.humidicola* has influenced the ammonia oxidizing archaea community of soil in monocropping as well as in intercropping with maize, and the monocropped maize area could modify that community in accordance of application chemical fertilizers. The areas under maize intercropping with *Panicum maximum* cv. Aruana, the pasture aerea with *Panicum maximum* cv. Aruana and Cerrado areas presented low similarity, which made it difficult to relate the structure of the ammonia oxidizing archaea community to the management used in the area.

**Keywords:** Crop-livestock integration, Nitrifying bacteria, Intercropping, Archeas, Molecular techniques.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Árvore filogenética da vida, baseada na configuração do rRNA, mostrando a separação dos grandes grupos biológicos: Bacteria; Archaea e Eukaryotes.....	20
<b>Figura 2</b> – Resumo do ciclo do nitrogênio .....	23
<b>Figura 3</b> – Esquema das etapas envolvidas na extração do DNA. ....	31
<b>Figura 4</b> – Etapas da PCR (Reação em cadeia da polimerase). ....	33
<b>Figura – 5</b> Dados pluviométricos mensais referentes ao período de Novembro de 2014 a maio de 2015. ....	39
<b>Figura 6</b> – Tratamentos: Sistemas de produção: M: milho em monocultivo; MA: milho consorciado com <i>Panicum maximum</i> cv. Aruana; MB: milho consorciado com <i>Uruchloa humidicola</i> ; B – <i>Uruchloa humidicola</i> ; A: <i>Panicum maximum</i> cv. Aruana. ....	40
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática dos equipamentos utilizados para a corrida eletroforética em gel de agarose em sistema vertical.....	43
<b>Figura 8</b> - Etapas para a preparação da PCR. 1) Reagentes utilizados na preparação da Reação 2) Preparação da reação; 3) Mistura de reagentes com os DNA's das amostras; 4) Programação no termociclador de acordo com o programa estabelecidos. ....	45
<b>Figura 9</b> – Preparação dos géis de poliacrilamida, e suas respectivas etapas de montagem. A) Preenchimento da seringa com a solução desnaturante; B) encaixe das seringas no aparelho que formará o gradiente; C) formação do gradiente desnaturante; D) formação do gradiente desnaturante.....	48
<b>Figura – 10</b> Dendograma de similaridade genética da comunidade de Bactérias nitrificantes do solo, construído a partir do índice de Jaccard. Método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos de diferentes sistemas de manejo em três repetições: milho em sistema de monocultivo (R1, R2, R3); milho em consórcio com <i>P. maximum</i> cv. Aruana (R1, R2, R3); milho em consórcio com <i>U. humidicola</i> (R1, R2, R3); área sob pastagem <i>P. maximum</i> cv. Aruana ( R1, R2, R3); área sob pastagem <i>U. humidicola</i> (R1, R2, R3) e área nativa de Cerrado (R1 e R2), em solo Latossolo Vermelho distrófico típico no Cerrado, DF. ....	50
<b>Figura – 11</b> Número de Unidades taxonômicas operacionais (UTO's) nos diferentes sistemas de manejo .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Iniciadores empregados nas reações de PCR. ....	44
<b>Tabela 2</b> – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para cada amostra de DNA na reação de PCR. ....	44
<b>Tabela 3</b> – Programa da PCR. ....	45
<b>Tabela 4</b> – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para cada amostra de DNA na reação de PCR. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A** - *Panicum maximum* cv. Aruana.

**AOA** – (Ammonia Oxidizing Archaea) Arqueas oxidantes de amônia

**AOB** – (Ammonia Oxidizing Bacteria) Bactérias oxidantes de amônia

**ARFL** - Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado

**B** – *Uruchloa humidicola*

**DGGE** - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**dNTP** – Trifosfato de deoxirrinucleotídeo (“2’-deoxynucleotides 5’triphosphates”)

**FBN** – Fixação Biológica de Nitrogênio

**ILP** - Integração Lavoura Pecuária

**M** – Milho (*Zea mays*) em monocultivo

**MA** - Milho consorciado com *Panicum maximum* cv. Aruana;

**MB** - Milho consorciado com *Uruchloa humidicola*

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio

**N<sub>org</sub>** – Nitrogênio na forma orgânica

**N** – Nitrogênio

**N<sub>2</sub>** – Nitrogênio atmosférico

**N<sub>2</sub>O** – Óxido Nítrico

**NO** – Óxido Nítrico

**NOB** - (Nitrite Oxidizing Bacteria) Bactérias oxidantes de nitrito

**NH<sub>3</sub><sup>-</sup>** - Amônia

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

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

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

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**R1** – Repetição 1

**R2** – Repetição 2

**R3** – Repetição 3

**SPC** – Sistema de Plantio convencional

**SPD** – Sistema de Plantio direto

**TGGE** - Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura

**UnB** - Universidade de Brasília

**UTO**- Unidade Taxonômica operacional

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivos gerais .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Comunidade microbiana do solo.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Processos mediados por bactérias relacionados com o ciclo do nitrogênio.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Amonificação.....	24
3.2.2 Nitrificação.....	24
3.2.3 Desnitrificação.....	28
3.2.4 Perdas de N no solo.....	28
<b>3.3 Técnicas moleculares aplicadas a análise de diversidade e estrutura das comunidades microbianas.....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Extração de DNA do solo.....	31
3.3.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase).....	32
3.3.3 DGGE.....	33
<b>3.4 Consorciações de cultivos na agricultura.....</b>	<b>35</b>
3.4.1 Sistema de Plantio Direto (SPD).....	35
3.4.2 Consorciação de culturas.....	36
3.4.3 Arqueas Oxidantes de Amônio (AOA) em áreas agrícolas.....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>

<b>4.1 Local de condução do experimento .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Coleta e armazenamento de amostras .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Extração de DNA de amostras do solo.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Eletroforese em gel de agarose .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>43</b>
<b>4.6 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....</b>	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Estrutura da diversidade de Arqueas oxidantes de amônio (AOA) avaliada pela técnica de PCR-DGGE .....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Práticas agrícolas como o plantio direto (SPD), rotação e consorciação de culturas vem sendo amplamente adotadas por grandes e pequenos produtores, em razão de seus benefícios econômicos e operacionais (PECHE FILHO., 2007).

Entretanto, tais práticas não se limitam apenas a esses benefícios, pois a adoção da cobertura vegetal continuamente sobre o solo promove inúmeros benefícios principalmente no que se refere à microbiologia do solo.

Tais práticas melhoram a estruturação, agregação, aeração, drenagem, entre outros atributos do solo (ALVARENGA et al., 2006), interferindo, assim, na interação entre os microrganismos e as espécies vegetais, resultando em uma maior taxa de mineralização de compostos orgânicos, e conseqüentemente o aumento da disponibilização de nutrientes para as plantas.

Do ponto de vista mineral, um dos nutrientes exigidos em maiores quantidades pelas plantas, é o nitrogênio. Espécies como o milho, por exemplo, demandam elevadas quantidades desse nutriente (MAO et al., 2011). A limitação deste para planta reduz o seu desenvolvimento, e conseqüentemente resulta em queda de produtividade, culminando em prejuízos econômicos (FARINELLI; LEMOS., 2012).

Desse modo, a compreensão da dinâmica desse nutriente no solo é de elevada importância, uma vez, que poderá fornecer ferramentas para diminuir prejuízos econômicos relacionados a processos como a lixiviação de nitrogênio (que além de perdas provoca a poluição de águas subterrâneas), a volatilização de amônia (ALVES., 2000), além de perdas por desnitrificação, que produzem gases poluentes para o meio ambiente, como os gases do efeito estufa ( $N_2O$ , NO) (PROSSER., 2016).

A nitrificação é uma das etapas que constitui o ciclo do nitrogênio, e é considerada uma das mais importantes do ciclo. É realizada por dois grupos de bactérias, sendo respectivamente, as Bactérias Oxidantes de Amônio AOB- (Ammonia Oxidizing Bactéria), e Arqueas Oxidantes de Amônio AOA- (Ammonia Oxidizing Achaea), responsáveis pela conversão de amônio a nitrito, e a partir da síntese do nitrito ocorre a conversão do mesmo a nitrato pelas Bactérias oxidantes de nitrito NOB- (Nitrite Oxidizing Bacteria).

As arqueas são microrganismos com uma morfologia e fisiologia diferenciada dos demais microrganismos. Elas são consideradas organismos ubíquos, pois se encontram em diversos habitats, além de apresentar uma resistência a condições extremas de temperatura, pH e salinidade, por exemplo. Apenas recentemente descobriam-se sua atividade nitrificante no solo, levando a uma maior necessidade de estudo a respeito desse grupo (OCHOA et al., 2015).

Sabe-se que determinadas condições interferem na atividade e na organização das AOA e AOB no solo. Dentre esses fatores, destacam-se: o pH, a concentração de  $\text{NH}_4^+$ , manejo, espécie vegetal, temperatura, entre outros (NUGROHO et al., 2006; TOURNA et al., 2008; TAYLOR et al., 2012; MCLEOD et al., 2016)..

Para a compreensão e o estudo desses microrganismos são necessárias ferramentas para sua análise, visto que, nem todo material genético para estudo dos microrganismos presentes no solo são obtidos através de meio de cultura. Nesse sentido as técnicas independentes de cultivo, ou técnicas moleculares, surgiram para facilitar e auxiliar no estudo dessas diferentes espécies de microrganismos do solo (TORSVIK., 1998).

Técnicas como a de PCR-DGGE, permitem estimar a diversidade e a estrutura da comunidade de microrganismos do solo, permitindo a comparação de diferentes áreas (SAIKI et al., 1988; FISHER & LERMAN., 1983), e diferentes manejos, apresentando através de uma fotografia uma ideia do comportamento e da organização desses organismos, em função das transições de manejo, e da composição dos diferentes ecossistemas.

Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos diferentes sistemas de manejo do solo, consorciado e em monocultivo, na comunidade de arqueas oxidantes de amônio utilizando técnicas moleculares (PCR-DGGE).

## **HIPÓTESE**

A diversidade e a estrutura da comunidade de arqueas oxidantes de amônio é estimulada pela consorciação do milho com gramíneas forrageiras, em comparação a áreas em monocultivo de milho.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar a influência dos diferentes sistemas de manejo do solo, consorciado e em monocultivo, na comunidade de arqueas oxidantes de amônio utilizando técnicas moleculares (PCR-DGGE).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar a estrutura da comunidade de arqueas oxidantes de amônio nas áreas consorciadas de milho com gramíneas forrageiras, com milho em monocultivo, utilizando a técnica PCR-DGGE.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Comunidade microbiana do solo

O solo é um ambiente extremamente rico, onde reside uma infinidade de organismos distintos que são responsáveis por complexos processos para a regulação e geração de vida no planeta. Dentre eles destacam-se a fixação biológica de nitrogênio, nitrificação e desnitrificação.

Graças à ação dos microrganismos do solo, é possível a ciclagem de macro elementos como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, estes por sua vez são liberados na solução do solo através da mineralização de compostos orgânicos. Entretanto, existem outras formas de liberação de macro e micronutrientes no solo, por exemplo, através da lise de células microbianas, que posteriormente sofrem uma sequência de processos metabólicos. Essas atividades metabólicas envolvem processos de oxidação-redução, ação de enzimas intra e extracelulares e interações específicas e inespecíficas entre os microrganismos.

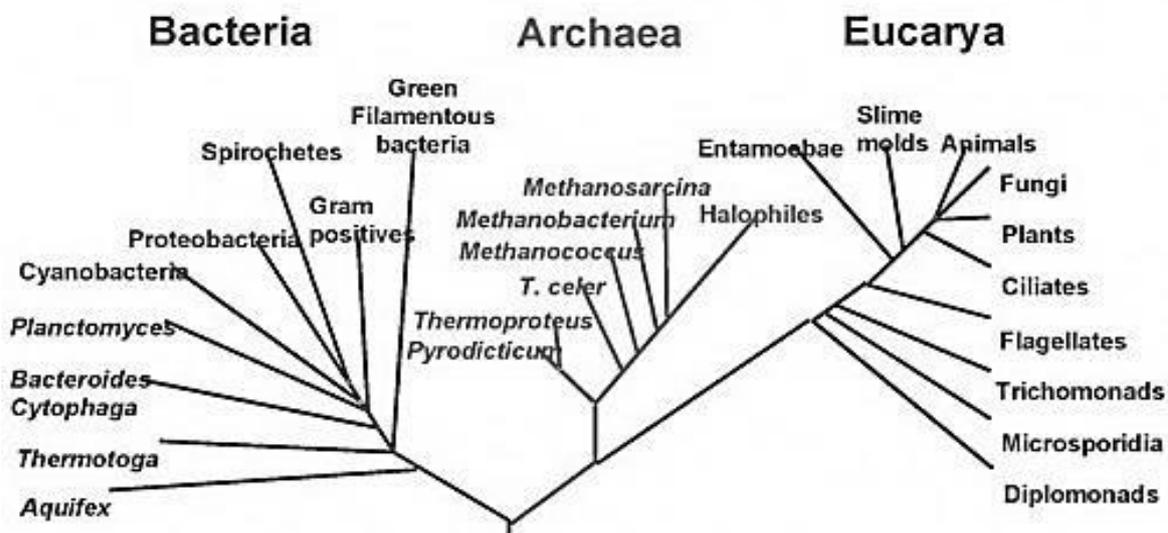
Segundo Cardoso (1992) à medida que um substrato é degradado, ocorrem modificações das condições do meio, induzido pelo metabolismo dos organismos colonizadores. Essas modificações podem favorecer o surgimento de outros grupos de organismos em função da produção de outras substâncias sintetizadas pelos mesmos, caracterizando uma sucessão de processos metabólicos da cadeia.

Dentre os microrganismos que residem o solo, destacam-se os fungos e as bactérias. Estes apresentam funções fundamentais na ciclagem e dinâmica de alguns macronutrientes, como exemplo, os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio, que atuam na mobilidade do fósforo e na ciclagem do nitrogênio, respectivamente.

Os fungos micorrízicos, vivem em associação com o sistema radicular das plantas superiores, estabelecendo uma relação simbiótica mutualística. Eles auxiliam na absorção de nutrientes (P e Mn), melhoram os atributos físicos (estruturação de agregados) do solo e também no uso da água (VALADARES; MESCOLOTTI; CARDOSO, 2016), além de proteger as plantas de patógenos e da presença de metais pesados (NOGUEIRA; CARDOSO, 2003).

As bactérias diazotróficas são os únicos organismos capazes de incorporar o nitrogênio atmosférico à matéria viva, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), e assim como os fungos micorrízicos estabelecem simbiose mutualística, nesse caso, com as raízes de espécies leguminosas, especialmente (MARIN et al., 1999) . Estes possuem a enzima nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação ente às duas moléculas de nitrogênio, posteriormente reduzindo-as a  $\text{NH}_3$  (forma assimilável de nitrogênio) pelas plantas (SIQUEIRA et al, 1994)

Os seres vivos são distribuídos em três grandes domínios: *Eucarya*, *Archea* e *Bacteria* (Figura 1). As arqueas são organismos procarióticos, do domínio *Archaea*, encontrados em uma ampla diversidade de habitats. São considerados microrganismos extremófilos, adaptados a condições extremas na maioria dos solos, como exemplo, altas temperaturas, elevada acidez, pela salinidade e/ou condições anaeróbicas (PAUL, 2007).



**Figura 1** – Árvore filogenética da vida, baseada na configuração do rRNA, mostrando a separação dos grandes grupos biológicos: Bacteria; Archaea e Eukaryotes. **Fonte:** Wheelis et al (1992)

Em virtude de suas características morfológicas e fisiológicas diferenciadas, vem sendo amplamente abordada em pesquisas científicas. Seus benefícios compreendem desde processos biotecnológicos para a indústria farmacêutica

(produtos terapêuticos, probióticos, antibióticos), até enzimas e polímeros para aplicação industrial e/ou tecnológica, na biorremediação e biolixiviação de poluentes, recuperação de minérios, entre outros (CARDOSO et al., 2003). Além disso, apresentam grande importância agrônômica, no estudo de grupos e espécies atuantes na ciclagem de nutrientes, como o nitrogênio, por exemplo, que será abordado mais adiante.

Alguns destes microrganismos possuem formas específicas de consumo de alimento/energia (fotolitotrofismo quimioautotrofismo, fotolitotrofismo, fotoaquilitotrofismo, quimiolitotrofismo, quimiorganolitotrofismo). Segundo Siqueira (1994) as bactérias formam o grupo de microrganismos em maior concentração e diversidade fisiológica no solo, sendo esta uma das características que justificam sua maior versatilidade e adaptabilidade. Elas podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, desempenhando diferentes funções (CARDOSO, 1992), como exemplo tem-se as bactérias amonificadoras, nitrificadoras, nitrato-redutoras, denitrificantes, sulforedutoras, diazotróficas, amilolíticas, celulolíticas, entre outras.

O estudo da diversidade de microrganismos é de suma importância, afinal, os microrganismos são importantes bioindicadores do solo, podendo levar a um diagnóstico prévio da saúde e qualidade do mesmo (MENDES et al., 2015).

Em função dos avanços tecnológicos, no Brasil, a partir das décadas de 70 e 80, teve-se o início da abertura de novas fronteiras agrícolas, principalmente no Centro-oeste brasileiro (ZILLI et al., 2003), levando a um uso mais intensificado dos solos e dos recursos naturais. Em virtude disso, surgiu a necessidade da busca por formas práticas e periódicas para o diagnóstico dos solos agricultáveis visando a manutenção de vida dos microrganismos e a conservação do solo de maneira geral, através de práticas agrícolas sustentáveis.

Dentre as diversas formas de avaliar a influência de práticas de manejo do solo sobre a comunidade microbiana, os estudos de grupos de microrganismos específicos, com o auxílio de técnicas moleculares vêm se destacando nos últimos anos (ANDREOTE, 2014). Essas informações auxiliam na escolha de práticas de manejo que garantam a produtividade das culturas e a funcionalidade da microbiota do solo.

### 3.2 Processos mediados por bactérias relacionados com o ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é o macronutriente mais exigido pelas plantas e, por conseguinte, limitante no crescimento destas (FARINELLI & LEMOS., 2012).

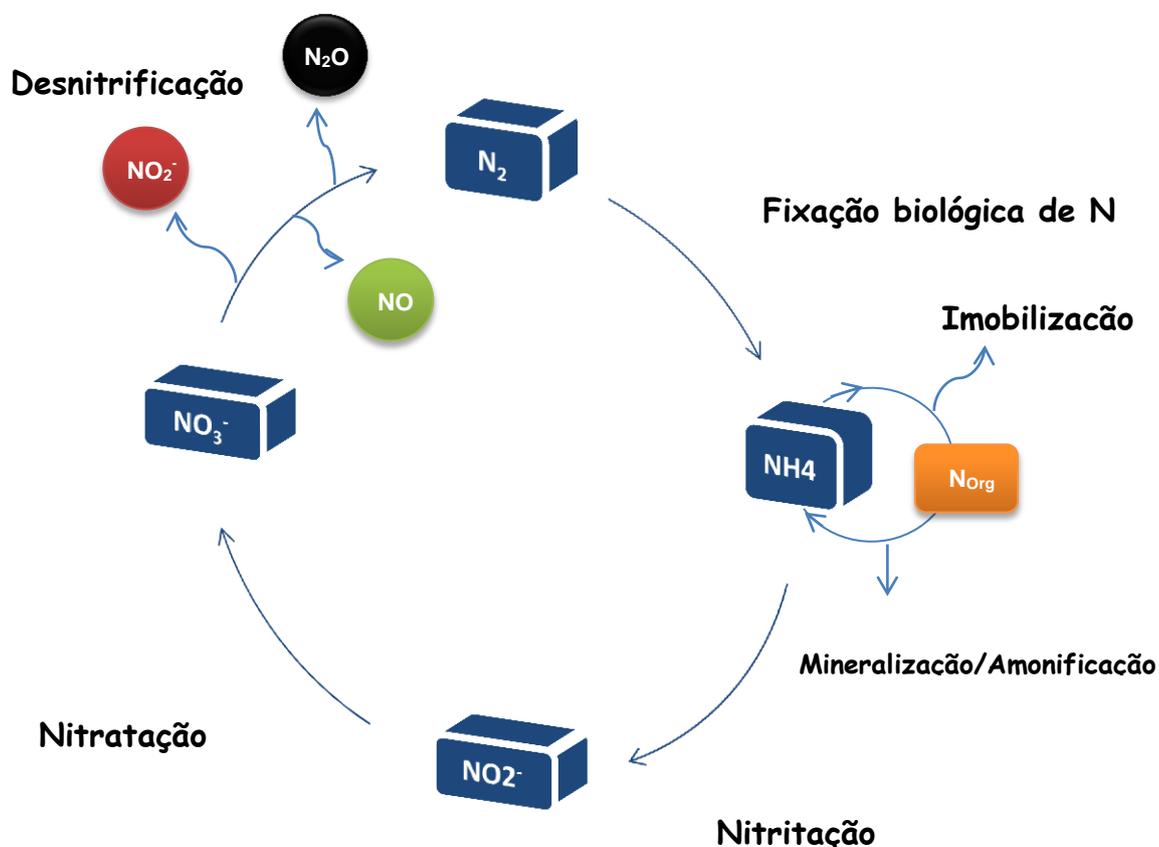
O nitrogênio encontra-se presente no solo nas formas orgânicas e inorgânicas. Na forma orgânica está presente nos restos vegetais e animais depositados na superfície ou perfil do solo (serapilheira, biomassa, húmus, matéria orgânica, etc.), na forma inorgânica através do nitrogênio gasoso  $N_2$  contido na atmosfera, óxido nitroso ( $N_2O$ ), amônia ( $NH_3$ ) ou na forma de íons ( $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ , e  $NH_4^+$ , etc.) presentes no solo.

Esse nutriente pode ser incorporado ao solo de diferentes maneiras, dentre elas, naturalmente, via descargas elétricas, onde ocorre a conversão do nitrogênio atmosférico a óxidos (RAIJ, 2011).

Outra forma de incorporação de N ao solo ocorre por meio de fertilizantes minerais, sintetizados industrialmente através de dois processos: Haber-Bosch (amônia), e Bosch-Meiser (ureia) (FREITAS et al .,2016), Além da incorporação por fertilizantes orgânicos (excrementos animais) sob a forma de uréia (KIEHL, 1985).

No entanto, posteriormente à sua incorporação no solo, o nitrogênio é ainda submetido a uma série de etapas que compõem o ciclo do nitrogênio, realizadas por diferentes grupos de bactérias e fungos (GOMES et al., 2000).

As bactérias participam ativamente do ciclo do nitrogênio (Figura 1), exercendo um importante papel na decomposição de matéria orgânica (BRANDÃO, 1992) atuando na transformação do N orgânico em N mineral (inorgânico), processo também denominado de amonificação. Adicionalmente, as bactérias são o único grupo de microrganismos do solo que realizam o processo de fixação biológica do nitrogênio, a principal entrada de nitrogênio no solo em ecossistemas naturais (VARGAS & HUNGRIA, 1997).



**Figura 2** – Resumo do ciclo do nitrogênio. Fonte: Dias (2016).

As bactérias do solo também participam de transformações inorgânicas que ocorrem no ciclo do nitrogênio. A nitrificação é a conversão de amônio ( $NH_4^+$ ) a nitrato ( $NO_3^-$ ), é predominantemente realizada por bactérias do solo com o metabolismo quimiolitotrófico (MADIGAN et al, 2004). Entretanto, alguns pesquisadores já relataram a existência de alguns fungos em áreas de floresta de clima temperado capazes de realizar a nitrificação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Outro processo mediado pelas bactérias do solo é a desnitrificação, definido como a conversão de nitrato ( $NO_3^-$ ) a formas gasosas de nitrogênio, como o óxido nítrico ( $N_2O$ ) e o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) (ALVES, 2000). É realizado principalmente por bactérias anaeróbias facultativas, a desnitrificação também pode ocorrer durante a primeira etapa da nitrificação, em um processo denominado de nitrificação desnitrificante (DIAS, 2016).

### 3.2.1 Amonificação

A mineralização da matéria orgânica do solo para compostos nitrogenados pode ser também compreendida como o processo de amonificação, que consiste na absorção destes compostos nitrogenados (proteínas, aminoácidos, peptídeos, entre outros.) (MORO et al., 2015), por bactérias denominadas de amonificantes.

Internamente a membrana celular os compostos sofrem um processo de desaminação, resultando na síntese de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e amônia ( $\text{NH}_3^-$ ) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), sendo que a predominância de um sobre o outro dependerá da faixa de pH do meio. Em faixas de pH mais ácido, predomina a síntese de amônio (PELISSARI, 2017) , entretanto a amonificação ocorre em condições variáveis de temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio podendo ser realizado por uma grande diversidade de microrganismos (DIAS, 2016).

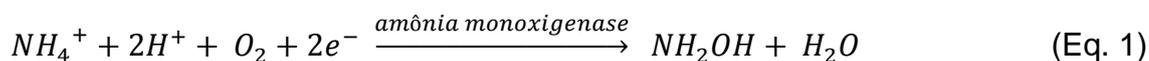
O amônio, resultante do processo de amonificação, é o substrato para o processo de nitrificação, que se inicia pela atividade de um grupo específico de bactérias (do domínio Bacteria e Archeae), denominadas de oxidantes de amônio (OCHOA et al., 2015).

Uma vez liberado no solo pela atividade dos microrganismos amonificadores, o amônio pode ter diversos destinos, além de ser utilizado como substrato pelos microrganismos oxidantes de amônio. O amônio pode ficar retido no complexo de troca da fração coloidal do solo, pode ser absorvido pelas plantas ou por outros microrganismos do solo e (VICTORIA et al, 1992) em condições ambientais específicas, pode ser lixiviado pela água que percola o perfil do solo (TRIVELIN et al., 2002)

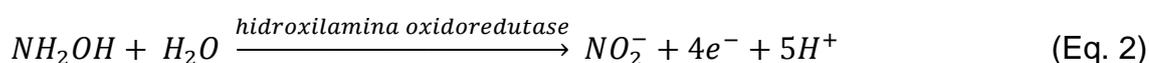
### 3.2.2 Nitrificação

A nitrificação ocorre em duas etapas e ambas em ambiente aeróbio, denominadas Nitritação e Nitratção, respectivamente. Na nitritação ocorre a oxidação de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) mediados pelas bactérias do domínio Bacteria e Archeae, denominadas bactérias e arqueas oxidantes de amônio (AOB, do inglês: ammonia oxidizing bacteria; AOA, do inglês: ammonia oxidizing archaea) (JARPA et al., 2007; DIAS, 2016; SCHAUSS et al., 2008 ).

A oxidação do amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Eq. 1) é catalisada pela enzima amônia monoxigenase (amoA), ligada à membrana citoplasmática das bactérias, e capaz de oxidar uma variedade de outros compostos de baixo peso molecular como fenol, metanol, metano e compostos halogenados alifáticos (PAUL, 2007).



A hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) formada pela ação da enzima amônia monoxigenase é posteriormente oxidada a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Eq. 2), catalisada pela enzima hidroxilamina oxidoreductase (Eq. 2) (PAUL, 2007).



Nesta etapa da nitrificação, quando realizada por bactérias quimiolitotróficas, pode ocorrer a formação de compostos intermediários entre a hidroxilamina e o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), como o óxido nítrico (NO) e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ocasionando o processo denominado de nitrificação desnitrificante (HINK & NICOL; PROSSER., 2016) . Alguns autores relataram que a nitrificação desnitrificante é favorecida em solos fertilizados em excesso com nitrogênio mineral, com elevada matéria orgânica, associados à condição de baixa oxigenação (WRAGE et al., 2001). Esse processo é importante, pois pode contribuir para as perdas de nitrogênio do solo para a atmosfera.

Uma vez formado o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), a etapa que se segue é a nitratação, onde os íons de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são oxidados a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) mediados por bactérias oxidantes de nitrato (NOB, do inglês: nitrite oxidizing bacteria), sendo o nitrato uma das principais formas minerais assimiláveis pelas plantas e a forma mais móvel de nitrogênio inorgânico no solo (RAIJ, 2011; OCHOA et al., 2015).

A nitrificação ocorre principalmente nas camadas mais superficiais dos solos, já que as bactérias e arqueas oxidantes de amônio (AOB, do inglês: ammonia oxidizing bacteria; AOA, do inglês: ammonia oxidizing archaea) necessitam de oxigênio para sua respiração, conseqüentemente há uma limitação do processo em solos ricos em argila e com maior grau de compactação (DIAS, 2016).

As AOB podem ser encontradas em baixas quantidades em ambientes naturais em função de seu crescimento ser mais lento (WARD., 1986 ), entretanto elas também podem ser encontradas em ambientes marinhos e em sistemas agrícolas (STEPHEN et al., 1996; PURKHOLD et al., 2000; JIA; CONRAD., 2009).

Por outro lado, as AOA são consideradas organismos ubíquos, podendo ser localizados em diferentes esferas do planeta encontrando-as em oceanos, sedimentos marinhos, rochas e ecossistemas terrestres (naturais e artificiais) (OCHOA et al., 2015),

Este caráter ubíquo explica sua diversidade genética, uma vez que essas apresentam tolerância a ambientes salinos, hipertermófilos, com baixos níveis de pH, ambientes com altas concentrações de metais pesados e de baixa concentração de O<sub>2</sub> (SÁYER, 2012).

Mesmo apresentando certa adaptabilidade a diferentes condições externas, os grupos de AOB e AOA apresentam certa tolerância em relação ao pH, temperatura, concentração de seu substrato (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) nos solos e também são influenciadas pela presença das plantas (NUGROHO et al., 2006; TOURNA et al., 2008; TAYLOR et al., 2012; MCLEOD et al., 2016).

Alguns estudos indicam que essas bactérias em solos agrícolas apresentam sensibilidade a baixo pH, sendo quase nula suas atividades em faixas de pH inferiores a 6,0 (NUGROHO et al., 2007). Valores ótimos ao desenvolvimento desse grupo variam entre 6,6-8,0 (DIAS, 2016).

Outra característica que influencia a presença e atividade desse grupo está relacionada à disponibilidade de N no solo. Alguns estudos indicam que à medida que a concentração de amônia diminui no solo, ocorre um acréscimo na oxidação da amônia pelas AOA (PROSSER & NICOL, 2012), sendo este grupo considerado sensível a altas concentrações de amônia no ambiente. Já para as AOB, a maior disponibilidade de nitrogênio inorgânico no ambiente é condição favorável para seu crescimento e atividade, fato que as tornam mais competitivas à medida que eleva-se a concentração de amônia (ZHANG et al., 2010; XIA et al., 2011).

Entretanto, o excesso de amônia proveniente da fertilização em áreas agrícolas ocasiona a acidificação do solo, aumentando a produção de óxido nitroso que é gerado durante a desnitrificação e, em especial na chamada nitrificação desnitrificante favorecida por essas condições ambientais (STEVENSON, 1986).

A cobertura vegetal e o sistema de manejo também interferem significativamente na atividade desse grupo. Segundo Mcleod et al (2016) espécies invasoras exóticas de gramíneas, aumentaram significativamente a disponibilidade de nitrogênio e a atividade das AOA e AOB no solo, todavia, a magnitude desse aumento varia de acordo com a espécie de planta.

Em uma pesquisa avaliando a influência das características da vegetação sobre a comunidade de AOA e AOB do solo, verificou-se que as plantas com alta demanda por nitrogênio e de crescimento rápido favorecem a abundância de AOA, independente da condição de acidez do solo (THION et al., 2016). Naturalmente mais abundantes nos solos, AOB foram pouco sensíveis à mudança da condição de acidez do solo, bem como pouco afetadas pela característica da espécie vegetal, conforme observado pelos mesmos autores.

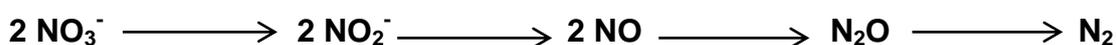
O efeito da irrigação de pastagem com efluente de esgoto tratado sobre a estrutura da comunidade de bactérias oxidantes de amônio foi avaliado por Paula (2008). Neste trabalho foi verificado que a irrigação excessiva com efluente alterou a estrutura da comunidade de AOB, evidenciado pelo padrão de UTO's diferenciado, obtido para a parcela que recebeu a dose de efluente recomendada para a pastagem. Esse resultado foi relacionado com a presença de nitrogênio solúvel no efluente e com o pH (em torno de 7,0).

Buscar compreender a influência desses fatores é de grande interesse para a prática agrícola, de forma a aprimorar práticas de manejo que maximizem a eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas, garantindo a manutenção dos processos naturais que ocorrem no solo, como a nitrificação.

### 3.2.3 Desnitrificação

Na desnitrificação ocorre a redução de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) que, em condições anaeróbias ou de pouca disponibilidade de  $\text{O}_2$ , será utilizado como acceptor final de elétrons (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esse processo é realizado por microrganismos heterotróficos facultativos, podendo ser estes: fungos, bactérias e algas. Os principais microrganismos atuantes na nitrificação são as bactérias associadas ao filo Proteobactérias (SCHMIDELL et al., 2007).

O resultante do processo é a síntese de formas gasosas de N representadas em quatro etapas redutivas sob a ação de diferentes enzimas. Essas fases podem ser observadas na sequência (MAO et al., 2011):



Como observado na equação, na desnitrificação surgiram as seguintes formas gasosas NO,  $\text{N}_2\text{O}$  fechando o ciclo com o retorno do  $\text{N}_2$  para atmosfera. Porém, é importante frisar que os gases  $\text{N}_2\text{O}$  e NO também podem ser produzidos durante a nitrificação, de acordo com as condições presentes no meio (SUBBARAO et al., 2015)

A compreensão dessa etapa que configura o fechamento do ciclo do N é fundamental, pois esse processo pode provocar perdas de N nos sistemas agrícolas além de contribuir com o aquecimento global. Estudos sugerem que  $\text{N}_2\text{O}$  possui um potencial de aquecimento global 300 vezes superior ao  $\text{CO}_2$  (HAHN & CRUTZEN, 1982; KROEZE., 1994; HUNGATE et al., 2003), resultando em prejuízos econômicos e ambientais

### 3.2.4 Perdas de N no solo

O nitrogênio é um nutriente bastante dinâmico no solo, sendo assim muito susceptível a perdas, logo que mudanças ambientais provocam a mudança em sua forma no sistema solo-planta-atmosfera.

Perdas de N são indesejáveis às culturas, pois além de prejuízos nutricionais e econômicos, o mesmo pode ocasionar sérios danos ambientais. Esse elemento

pode ser perdido pelo solo de diferentes formas, sendo que as principais formas ocorrem por meio da erosão, volatilização, lixiviação e desnitrificação.

Na volatilização ocorre a hidrólise da ureia, levando ao aumento do pH do solo ocasionando a volatilização do  $\text{NH}_3^-$  (ALVES et al., 2000). Alguns fatores são preponderantes nesse processo, sendo estes, o teor de umidade, pH, cobertura vegetal (SPD), fonte de N aplicada e o tipo de manejo utilizado (BAYER & FONTOURA., 2004 apud MOTA et al., 2015).

O nitrato é uma das principais formas de absorção de N pelas plantas, sendo este um íon bastante móvel no perfil do solo, portanto, uma vez que este se encontra aquém da zona radicular da planta pode ser facilmente lixiviado em condições de chuvas frequentes e abundantes ou sistemas de irrigação irregulares.

Segundo Pinto (2015, p. 123) citado por Pinto et al. (2017):

Os solos arenosos do Cerrado, cultivados sob irrigação e fertirrigação constantes, as perdas de N ocorrem principalmente por lixiviação, podendo atingir a taxa média de  $128 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  para uma dose de  $600 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N.

No entanto, a lixiviação associada à erosão do solo pode ser considerada a principal forma de perda de N no solo, e ocorre basicamente pela presença de água em excesso no solo ou por ação do vento, provocando o transporte de nutrientes principalmente nas camadas mais superficiais do solo. De acordo com Alves et al (2000) cerca de  $5 \times 10^{12} \text{ kg}$  de solo são perdidos anualmente através da erosão, dos quais 80% são perdidos por efeito da água e o restante através da erosão eólica.

Como já foi explicitado anteriormente no ciclo do nitrogênio, o nitrato proveniente da nitrificação pode seguir três “caminhos” diferentes no solo: 1) ser absorvido pela planta; 2) ser lixiviado ou 3) sofrer desnitrificação.

A desnitrificação virá a ocorrer, caso o solo encontre-se em anoxia, ou em baixo suprimento de  $\text{O}_2$  seguindo a rota inversa da nitrificação. Nesse processo ocorre a produção e emissão de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) um dos gases do efeito estufa.

Em ecossistemas agrícolas e naturais essa emissão corresponde entre 56 a 70% do total de  $\text{N}_2\text{O}$  global emitido anualmente (DAVIDSON et al., 2009; SYAKILA

& KROEZE, 2011), sendo mais de 40% desse montante provenientes da adubação nitrogenada (PRATHER et al., 2012).

De acordo com estudos realizados por Pinto et al. (2017), A perdas por desnitrificação variam entre 2% e 25% em sistemas com solos bem drenados.

A compreensão da dinâmica do N no solo auxilia na decisão de quais culturas devem ser utilizadas na rotação e consórcio de culturas, além do momento e quantidades adequadas aplicadas via fertilizante para as culturas (NETO et al., 2010).

### **3.3 Técnicas moleculares aplicadas a análise de diversidade e estrutura das comunidades microbianas**

Moreira & Campos (2013) afirmam que, técnicas moleculares são fundamentais na classificação microbiana e em estudos de diversidade, uma vez que são capazes de detectar microrganismos cultiváveis e não cultiváveis.

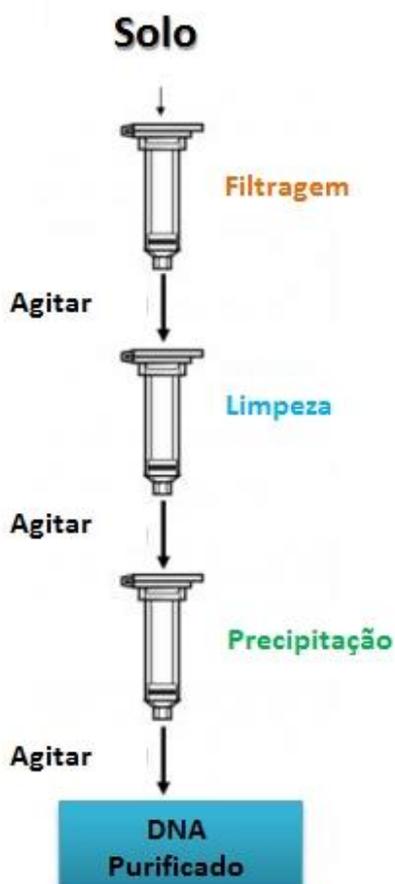
São inúmeras as técnicas, com diferentes abordagens e finalidades em relação ao estudo de diversidade, porém, para tanto é necessário material genético (RNA ou DNA) para proceder a análise da estrutura da comunidade e da diversidade.

O DNA metagenômico, pode ser entendido como o conjunto de todas as formas de vida presentes em determinado ambiente (no caso, o solo), adquirido independentemente de técnicas de cultivo (TORSVIK et al., 1998). Técnicas independente de cultivo permite-nos reconhecer genes responsáveis por codificar enzimas, envolvidas, por exemplo, nas transformações de nitrogênio (LEININGER et al., 2006)

Esse “DNA” corresponde à microbiota representada pelo conjunto de microrganismos que estão interligados à fração mineral do solo por meio de micro e macroagregados nas frações coloidais, ou seja, quanto maior a diversidade de um determinado solo, maior será as sequências de DNA's encontrado nestes (WECHTER et al., 2003 apud MESQUITA, 2011).

### 3.3.1 Extração de DNA do solo

A extração de DNA do solo resume-se a ruptura da parede e/ou membrana celular da comunidade de microrganismos presente na amostra de solo, fornecendo dessa forma, o DNA contendo cromossomos dos microrganismos (MESQUITA, 2011). Na extração de DNA do solo, com auxílio de um kit comercial, segue-se um protocolo fornecido pelo fabricante. O processo inicia-se com o enfraquecimento da parede/ membrana celular provocado pelos diferentes reagentes químicos, e em seguida ocorre o rompimento destas, realizado através de atrito molecular e entre cristais inseridos juntamente a amostra de solo, que é realizado em três etapas: precipitação, filtragem e limpeza (eluição do DNA) (Figura 3) que costumam ser repetidas por algumas vezes até a obtenção do DNA purificado (TORSVIK, 1980).



**Figura 3** – Esquema das etapas envolvidas na extração do DNA. Fonte:

(<http://neobio.com.br>, acesso:05/11/2017)

Com a obtenção do DNA purificado é possível realizar a análise de comunidades, e estrutura de comunidades microbianas através de técnicas moleculares como: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), PCR em tempo real, ARFL (Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado), DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) TGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura), Extração e purificação de DNA, entre outras inúmeras técnicas. A seguir, algumas dessas serão apresentadas e brevemente detalhadas.

### 3.3.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase)

A PCR pode amplificar de forma seletiva uma única cópia de uma “sequência alvo” específica, *in vitro* (SAIKI et al., 1988), presente em uma mistura complexa de outras moléculas de DNA (REIS JUNIOR et al., 2002), mediante a execução de algumas etapas em um aparelho denominado termociclador. Para que a reação ocorra, faz-se uso de uma solução de trabalho, onde é adicionado o DNA da amostra de interesse e reagentes para amplificação dessas regiões específicas. As etapas da reação são descritas a seguir:

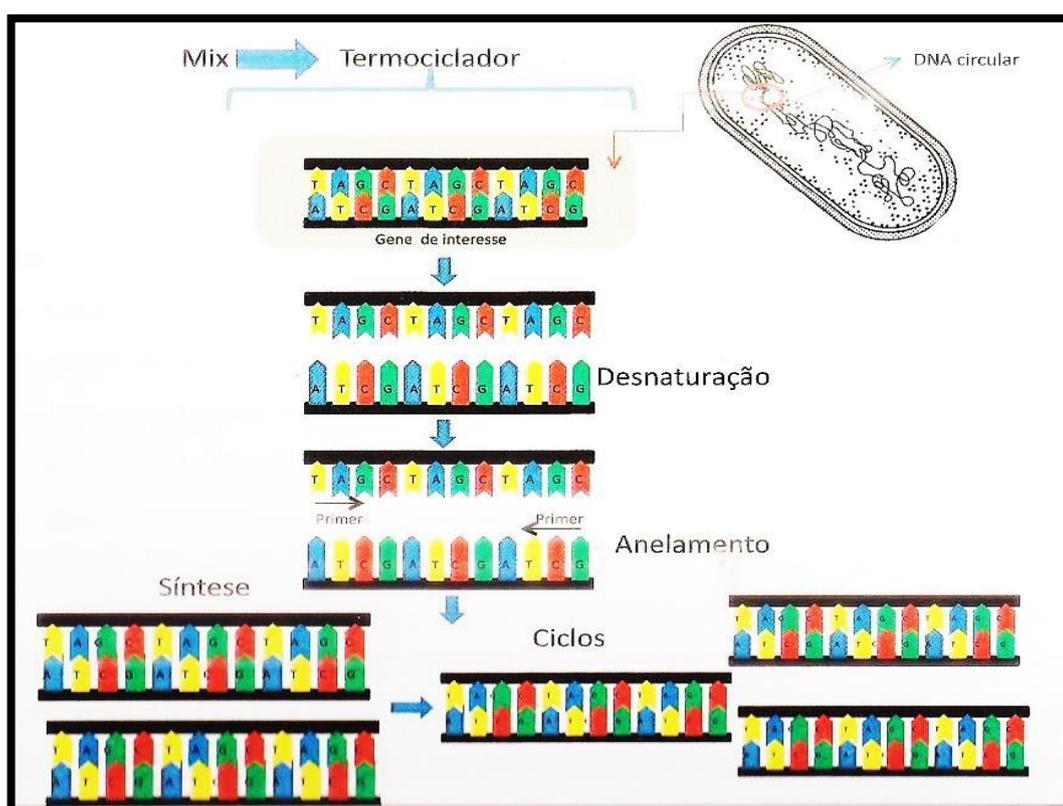
1) Desnaturação (94-95 °C) promove o rompimento das pontes de hidrogênio que ligam as fitas de DNA. Após a separação das fitas, ocorre uma considerável queda da temperatura para aproximadamente 60°C para viabilizar execução da etapa seguinte.

2) Anelamento (55-62°C) os pares de iniciadores/primers (oligonucleotídeos curtos) são anelados à regiões específicas de ambas as fitas de DNA em direções opostas (3'—5' e 5'---3') direcionando a DNA polimerase á síntese de novas fitas, detalhado na próxima etapa;

3) Extensão (síntese) (72°C) é catalisada através de uma enzima termoresistente, a *Taq* DNA polimerase. Essa enzima foi purificada de um microrganismo termófilo (*Thermus aquaticus*) (OLIVEIRA et al., 2016), que possibilitou a ampliação do uso dessa técnica, visto que a temperatura era um fator limitante à sua execução. Outros reagentes são necessários nessa etapa, sendo estes os dNTP's, que funcionam com substratos para a enzima *Taq* DNA polimerase. O Tampão funciona como regulador do ambiente da reação, de forma

adequar o pH do meio, já os primers possuem a função de se anelar as sequências-alvo das regiões de interesse, e o cátion  $MgCl_2$ .

Essas etapas são repetidas por vários ciclos, geralmente variam de 25 a 38 ciclos, dando origem a milhares de cópias do fragmento de interesse do DNA da amostra ao final do processo. O produto da PCR posteriormente pode ser utilizado para dar sequência a outros estudos por meio de outras técnicas nas quais poderá ser analisada a estrutura da comunidade microbiana, estudos a respeito da filogenia por meio de sequenciamento, dentre outros.



**Figura 4** – Etapas da PCR (Reação em cadeia da polimerase); **Fonte:** Moreira & Campos (2013).

### 3.3.3 DGGE

Técnica descrita por Fisher & Lerman (1983), é utilizada para análises de diversidade genética e estrutura de comunidades microbianas. O princípio básico dessa técnica implica na desnaturação das moléculas de DNA ao longo de um gel em gradiente desnaturante composto por poliacrilamida.

A desnaturação ocorre por meio dos reagentes químicos uréia e formamida, que realizam a separação das bases nucleotídicas do DNA através do rompimento das pontes de hidrogênio. Nessa técnica, o princípio de separação das diferentes moléculas de DNA ocorre em função do número e das sequências de bases dos nucleotídeos, e não em função do tamanho dos produtos (LAMBALIS et al., 2005).

O gel é composto de poliacrilamida (acrilamida + bis-acrilamida), formando um gradiente em diferentes concentrações, por onde esses produtos percorrem enquanto são desnaturados. Ao final da desnaturação de todo o fragmento de DNA, o mesmo ficará depositado na região do gel em que esteve completamente desnaturado (ABOIM., 2004).

Cenciani (2007) fez uma abordagem molecular, com o objetivo de avaliar o impacto na comunidade microbiana em três diferentes solos da região amazônica (capoeira, pastagem e floresta) em estações diferenciadas (seca e chuvosa). O autor avaliou a comunidade bacteriana pela técnica PCR-DGGE e o grupo de AOB por sequenciamento. Concluiu-se que a transição entre áreas de pastagem e capoeira, além da variação ambiental, interferiram na comunidade bacteriana; por outro lado as AOB não foram localizadas na área sob floresta, em detrimento à área de pastagem onde esse grupo mostrou-se presente.

Outra análise semelhante foi realizada por Mesquita (2011), onde se buscou avaliar a comunidade de fungos e bactérias em diferentes estações (chuvosa e seca) em regiões do Cerrado. A conclusão foi que essa comunidade mostrou-se semelhante nas diferentes áreas amostradas e sob condições ambientais distintas.

Essa técnica, além de estimar a diversidade e a estrutura de uma comunidade de microrganismos de um solo, permite-nos uma análise comparativa entre diferentes ecossistemas e condições ambientais, auxiliando na tomada de decisão sobre quais/qual sistemas de manejos adotar em diferentes sistemas de cultivo.

### 3.4 Consorciações de cultivos na agricultura

#### 3.4.1 Sistema de Plantio Direto (SPD)

O Sistema de plantio direto (SPD) parte do princípio em manter-se o solo sempre coberto (cobertura viva ou morta), rotacionando e/ou consorciando plantas de cobertura a culturas comerciais, através do revolvimento mínimo do solo (PECHE FILHO, 2005). Envolve diferentes técnicas e modalidades, as quais serão descritas adiante.

Usualmente são utilizadas como plantas de cobertura, espécies leguminosas ou gramíneas forrageiras. As gramíneas forrageiras são muito utilizadas em outra modalidade do SPD, a Integração Lavoura Pecuária (ILP). A ILP busca intercalar culturas graníferas, no caso do milho e da soja, com espécies forrageiras, em rotação nas áreas de pastagem (ALVARENGA; NOCE., 2006). Esse sistema tem se popularizado no Brasil central, principalmente, em virtude dos problemas relacionados à degradação de pastagens (ALVARENGA et al., 2006).

O SPD possui inúmeras vantagens se comparado ao sistema convencional, no que se refere ao manejo e custos de produção, além de promover a sustentabilidade e favorecer a atividade biológica dos microrganismos.

Muzilli (2000), afirmou que o plantio direto (PD) contribui para o aumento da matéria orgânica e estimula a atividade biológica, melhorando a agregação de partículas e a estruturação física, favorecendo a retenção de água e a disponibilidade de nutrientes no perfil do solo.

Os aspectos que influenciam na qualidade do solo promovidos por esses conjuntos de manejos podem ser resumidas na sequência de acordo com Alvarenga et al 2006:

- a) Espécie vegetal: O sistema radicular influencia diretamente na aeração, estruturação e retenção de água no solo; O padrão de produção de fitomassa dessa espécie também influencia, de forma que quanto maior for sua produção de fitomassa, maior será sua abrangência e cobertura no solo;

- b) Fertilidade: reduz o consumo de fertilizantes, pois altera a dinâmica dos microrganismos, conseqüentemente aumenta a disponibilidade de nutrientes para cultura;
- c) Facilita o manejo de pragas e doenças quando incorporada uma espécie de cobertura que quebre o ciclo de uma praga chave ou uma doença da cultura comercial;
- d) Controla processos de lixiviação de nutrientes e erosão do solo;
- e) Controle e supressão de plantas daninhas: inibe a emergência de plantas daninhas, reduzindo a competição por nutrientes;
- f) Manejo: Economia de mão de obra em função da diminuição ou eliminação do preparo do solo (aração, gradagem, etc); facilidade de manejo.

### **3.4.2 Consorciação de culturas**

A consorciação de culturas também integra o SPD, e consiste na ocupação de duas ou mais culturas simultaneamente em uma mesma área e/ou sistema de rotação (SUDO et al., 1998). Utilizam-se diferentes espécies vegetais, com diferentes ciclos e arquiteturas, podendo ou não ser semeadas em um mesmo período, podendo apresentar interações em determinado momento vegetativo. (VIEIRA, 1998; TEIXEIRA et al., 2005).

Esse sistema possui inúmeras vantagens, e uma delas é o potencial de retirada de água do solo, sendo que este é superior ao monocultivo (MOREIRA et al., 2007), essa capacidade torna-se uma aliada, no sentido de se reduzir a perda de nitrogênio por lixiviação.

Outro fator de grande influência dos sistemas de consórcio, principalmente com gramíneas, constitui-se na transferência de nitrogênio resultante da decomposição dos restos vegetais (PACIULLO et al., 2003), culminando em ganhos de produtividade. Esse efeito é ao contrário do que ocorre no monocultivo, pois o suprimento de N ocorre principalmente via fertilizante, o que torna o sistema mais dispendioso do ponto de vista econômico, e menos sustentável do ponto de vista ambiental.

O aproveitamento de nutrientes pelas culturas é superior quando em consórcio com outra cultura. De acordo com Magalhães (1997) a *Urochloa brizantha* apresentou maior extração de nutrientes quando consorciada com o milho em comparação com o monocultivo, no entanto essa capacidade de extração pode variar de acordo com a espécie, população de plantas e época de cultivo (FIETZ et al., 2013)

Por outro lado a produção de biomassa das espécies vegetais utilizadas em consórcio podem interferir diretamente na relação C/N dos resíduos que se depositam no solo. Altas relações C/N podem provocar a imobilização de N mineral, cessando a nitrificação temporariamente por insuficiência de substrato ( $\text{NH}_3$ ) (MOREIRA; SIQUEIRA., 2006). A cobertura vegetal influencia diretamente na atividade microbiológica do solo, visto que as bactérias atuantes no ciclo do N podem aumentar ou diminuir a mineralização de compostos orgânicos, à medida que essa relação diminui (LOPES et al., 2004).

Além da presença da planta de cobertura, as espécies também influenciam na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$ , pois alguns estudos indicam que solos sob pastagem e solos sob vegetação natural (florestas) apresentam maiores quantidades de  $\text{NH}_4^+$  em contrapartida baixos valores de  $\text{NO}_3^-$  em função da inibição da nitrificação por substâncias excretas pelo sistema radicular de gramíneas e, monoterpenos liberados pelas espécies arbóreas em solos florestais. (MOREIRA; SIQUEIRA., 2006).

### **3.4.3 Arqueas Oxidantes de Amônio (AOA) em áreas agrícolas**

Até onde se conhecia, apenas as (AOB) detinham a capacidade de oxidar a amônio a nitrato. Em recentes estudos descobriram-se que as AOA também possuem o gene *amoA* da enzima monooxygenase (ARP et al., 2002; KOOPS et al., 2006), sendo esta a principal enzima atuante na nitrificação, concluindo então que as AOA também possuem a mesma capacidade de oxidar amônio como as AOB.

A partir desta descoberta foram realizados estudos para verificar a presença e a abundância desse grupo nos diferentes habitats e ecossistemas, onde então

observaram que as AOA encontravam-se presentes na maioria deles (FRANCIS et al., 2005; LEININGEE et al., 2006; WUCHTER et al., 2006; LAM et al., 2007).

Leininger et al (2006) examinaram a abundância de AOA e AOB em doze tipos de solos diferentes (entre solos naturais e agrícolas) de diferentes regiões da Europa. O resultado obtido a partir das análises indicou que sem nenhuma exceção entre os diferentes solos predominaram o grupo de AOA sobre as AOB. Outras pesquisas confirmaram essa informação para a maioria dos solos examinados até então (HE et al., 2007; NICOL et al., 2008; SCHAUSS et al., 2009).

No entanto, Jia & Conrad (2009), em suas análises, concluíram que a presença das AOA é de fato superior à de AOB, porém questionaram a hipótese da taxa de nitrificação ser realizada predominantemente pelas mesmas, sugerindo que este processo em solos agrícolas possa estar predominantemente associado AOB, uma vez que estes solos apresentam maiores concentrações de amônia, por conta da fertilização.

Segundo os mesmos autores, a profundidade do solo também apresenta diferenças na presença desses grupos, os autores iam constatando que a população de AOA predomina tanto na superfície, quanto em profundidade, apresentando uma população significativamente superior às AOB.

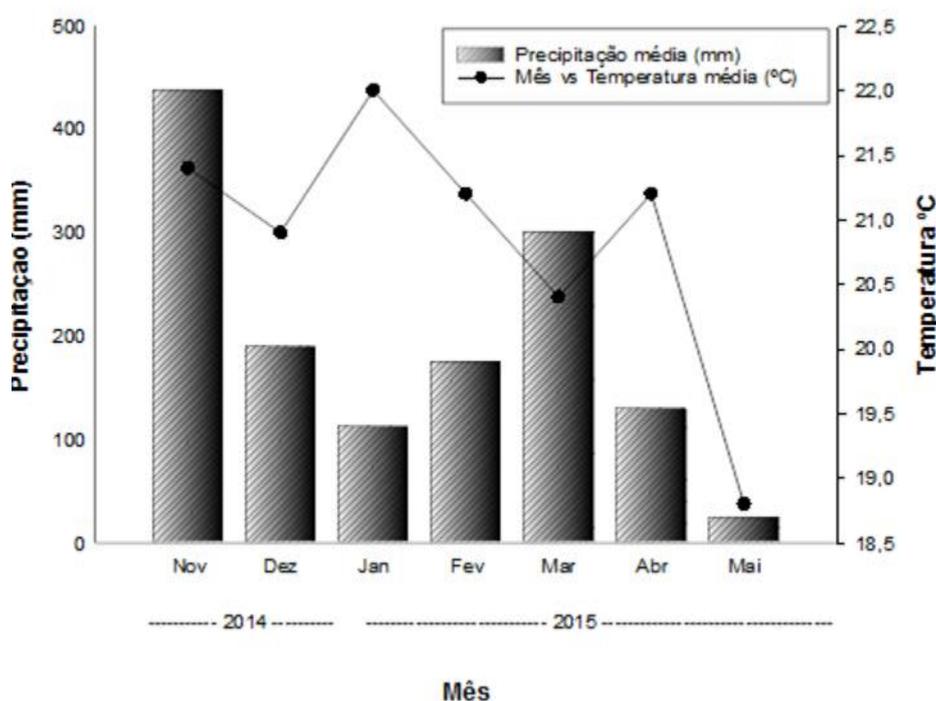
Alguns fatores ambientais e intrínsecos do solo interferem negativamente essa comunidade, sendo eles: o baixo pH (abaixo de 6 ocorre uma diminuição da atividade nitrificante), a concentração de amônio, a concentração de  $O_2$ , a temperatura, entre outros.

São necessários mais estudos a respeito desse grupo de oxidantes de amônio, a fim de compreender suas interações com diferentes espécies vegetais, principalmente de interesse agrônomo, as interações com outros microrganismos, buscando-se aprimorar sua atividade nitrificante conduzindo-a a um equilíbrio, visando mitigar o seu potencial de emissão de gases poluentes do efeito estufa, além da contaminação de fontes subterrâneas pelo manejo inadequado do solo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de condução do experimento

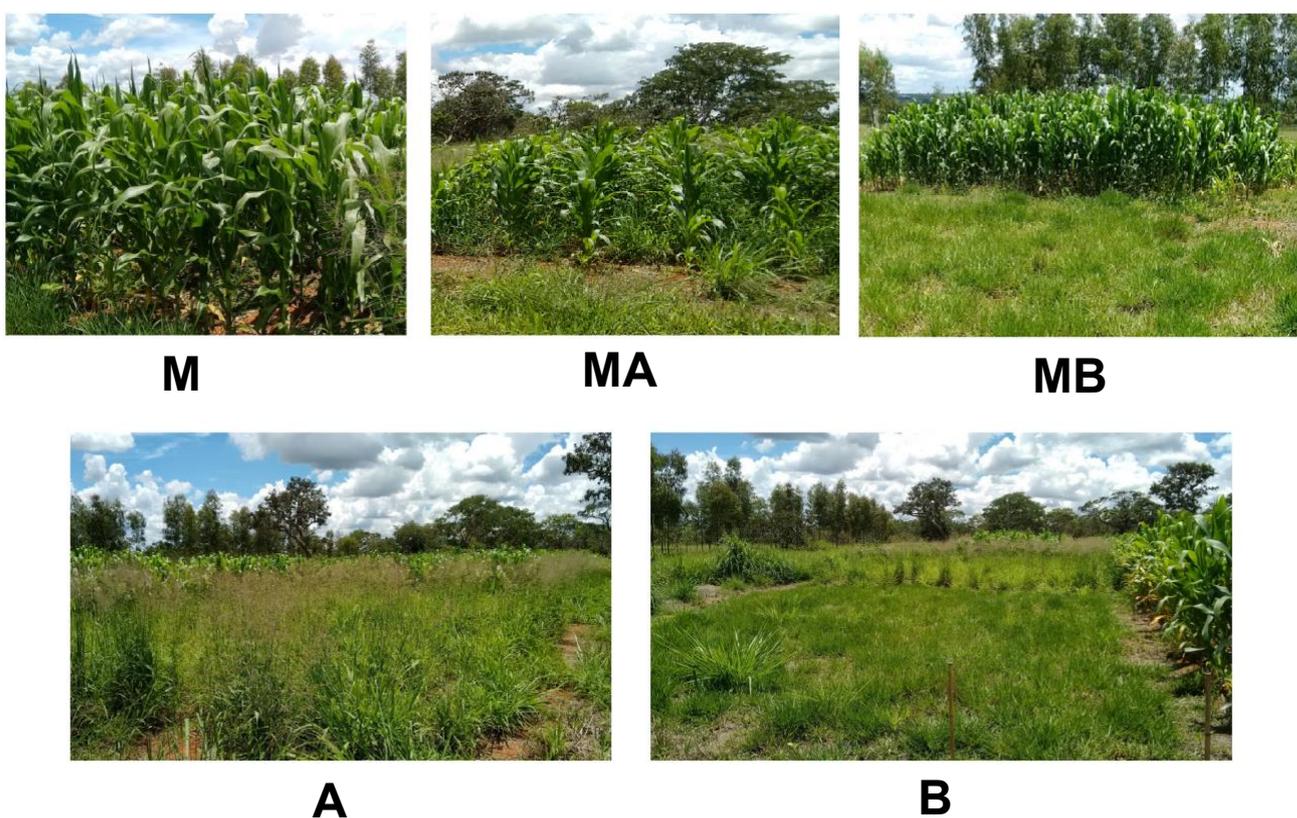
O presente trabalho foi conduzido na área experimental da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (UnB), situado no núcleo rural Vagem Bonita-DF (latitude 15° 55" S. Longitude 47° 51" W e altitude de 1080 metros). A região apresenta um clima do tipo Aw segundo a classificação Köppen (tropical estacional de savana), caracterizado por períodos chuvosos compreendendo os meses de outubro a março e uma estação seca variando dos meses de abril a setembro. O solo do campo experimental é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico (Embrapa, 2006).



**Figura – 5** Dados pluviométricos mensais referentes ao período de Novembro de 2014 a maio de 2015. **Fonte:** Estação meteorológica automática (Fazenda Água Limpa – UnB)

A área original do experimento encontrava-se sob pastagem cultivada com capim *Andropogon Gayanus*, variedade Planaltina, por um período consecutivo de

seis anos, e durante esse período a área foi submetida à gradagem e calagem de acordo com as exigências requeridas por análises químicas. A partir do ano de 2007 foi instalado o experimento em voga. Os sistemas de manejo utilizados foram estabelecidos em sistema de plantio direto (SPD), sendo utilizados cinco tratamentos respectivamente: (T1) **M** – milho em monocultivo (híbrido BG 7055); (T2) – **MA** milho em consórcio com *Panicum maximum* cv. Aruana; (T3) – **MB** milho consorciado com *Urechloa humidicola*, (T4) **B** – *Urechloa humidicola*; (T5) – **A** *Panicum maximum* cv. Aruana, dispostos em delineamento em blocos casualizados, com três repetições, totalizando 15 parcelas de 80 m<sup>2</sup> e (T6) **C** - uma área de referência de Cerrado Nativo, localizada próxima ao experimento.



**Figura 6** – Tratamentos: Sistemas de produção: **M**: milho em monocultivo; **MA**: milho consorciado com *Panicum maximum* cv. Aruana; **MB** milho consorciado com *Urechloa humidicola*; **B** – *Urechloa humidicola*; **A**: *Panicum maximum* cv. Aruana.

Fonte: Méndez (2016).

O último plantio do milho foi realizado no dia 23 de dezembro de 2014, para a safra 2014-2015. A adubação anual nos tratamentos com milho foi de 30 kg N ha<sup>-1</sup> (uréia), 70 kg/ha<sup>-1</sup> de KCl no plantio e duas aplicações em cobertura com 45 kg de N/ha<sup>-1</sup> (uréia) e 43 kg/ha<sup>-1</sup> de KCl, a densidade de plantio utilizada foi de sete plantas por metro linear, com um espaçamento de 0,95 m entre linhas, nos tratos culturais foi realizado o controle da lagarta do cartucho, com inseticida do grupo químico Benzoiluréia, (300 mL/ha<sup>-1</sup>) e, nas parcelas consorciadas, o crescimento das forrageiras foi controlado com a utilização de capina manual e glifosato, (3 L/ha<sup>-1</sup>). Nas culturas forrageiras, realizou-se a semeadura a lanço (20 kg/ha<sup>-1</sup>), de acordo com o seu valor cultural, e na adubação foram utilizados 60 kg N/ha<sup>-1</sup> (uréia), 90 kg/ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (super simples) e 60 kg/ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (KCl).

No trato cultural das pastagens realizam-se roçagens, antes do plantio do milho, nas parcelas consorciadas e nas parcelas solteiras, no mesmo período, antes do início do ciclo de cada safra.

#### **4.2 Coleta e armazenamento de amostras**

As amostras de solo foram coletadas no período de florescimento do milho (Março de 2015) coincidindo com a estação chuvosa, na profundidade de 0-10 cm utilizando um trado do tipo holandês. Em cada parcela coletaram-se amostras aleatórias, compostas de seis subamostras nas linhas e entrelinhas de plantio. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, sendo uma alíquota (20g) acondicionada em pequenos tubos de plástico e armazenados em freezer – 80 °C.

#### **4.3 Extração de DNA de amostras do solo**

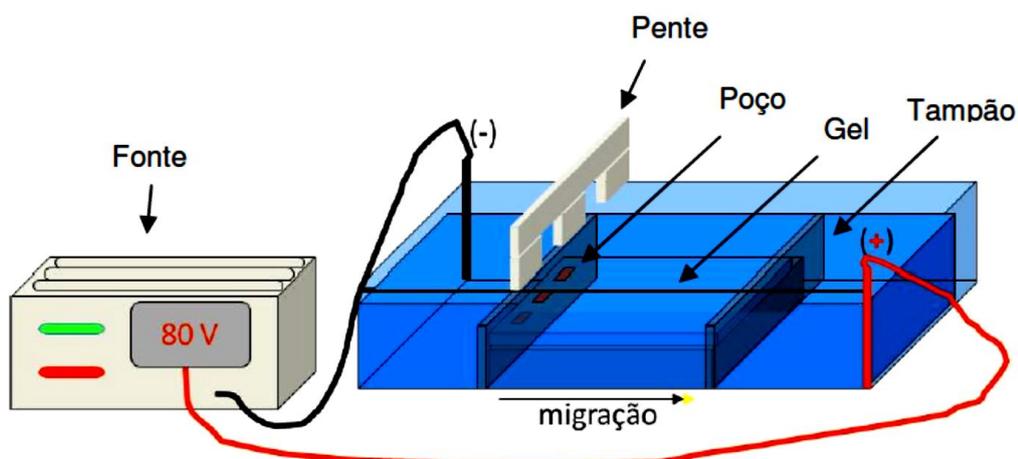
A extração de DNA das amostras de solo, foi realizada no laboratório de ecologia de ecossistemas, do departamento de ecologia do IB/UnB, com o auxílio do Kit FastDNA SPIN da marca MP Bio, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (com algumas alterações).

No protocolo empregado na extração (fabricante), seguiram-se as seguintes etapas:

- 1) adicionou-se 500 mg da amostra de solo ao “Lysing Matrix E tube” (tubos de lise contendo sílica) e;
- 2) adicionou-se 978  $\mu\text{L}$  da solução “Buffer Sodium Phosphate” (tampão de fosfato de sódio pH 8,0) e 122 mL da solução “MT Buffer”;
- 3) Homogeneizou-se a 8000 rpm por 40 segundos no Vórtex seguido de uma centrifugação a 12000 rpm por 7 minutos.
- 4) O sobrenadante então foi despejado para um tubo eppendorf de 2 mL de capacidade e adicionaram-se 250  $\mu\text{L}$  da solução de precipitação de proteínas, homogeneizando-se manualmente por inversão contínua e em seguida centrifugado a 12000 rpm por 7 minutos.
- 5) Transferiu-se o sobrenadante para um tubo estéril de 15 mL, adicionou-se 1 mL do Binding Matrix Superior, em seguida misturada por inversão contínua durante 2 minutos e subsequentemente deixado em repouso por 3 minutos à 31°C
- 6) O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril de 15 mL, adicionou-se 1 mL do Binding Matrix Superior, em seguida o mesmo foi misturado por inversão contínua durante 2 minutos e subsequentemente deixado em repouso por 3 minutos á temperatura ambiente.
- 7) Após esse período, descartou-se 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e o restante foi re-suspendido com uma pipeta e transferidos 600  $\mu\text{L}$  para o tubo filtro e centrifugado a 12000 rpm por 90 segundos.
- 8) O produto líquido resultante da centrifugação foi descartado e o procedimento foi reproduzido novamente com a solução restante.
- 9) Posteriormente, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de SEWS-M (lavagem de sais e etanol) ao filtro seguido de uma centrifugação a 12000 rpm por 90 segundos, o filtrado foi descartado e novamente centrifugado por 3 minutos.
- 10) O filtro foi transferido para um tubo estéril e deixado em repouso por 5 minutos á temperatura ambiente, posteriormente foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da solução DES e incubado no bloco a 55 °C durante 5 minutos e finalmente uma nova centrifugação a 12000 rpm por 90 segundos para o descarte do filtro.

#### 4.4 Eletroforese em gel de agarose

Depois de completada a extração verificou-se a quantificação do DNA extraído através da corrida em gel de agarose a 1,2%. As amostras aplicadas aos “slots” do gel foram preparadas com 3  $\mu\text{L}$  do DNA extraído e 5  $\mu\text{L}$  de corante (azul de bromofenol). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X a 80 volts e 400 amperes durante uma hora, posteriormente o gel foi imerso numa solução de brometo de etídio (2 $\mu\text{g}$  / mL) durante 20 minutos. A revelação da imagem foi realizada sob luz UV com ajuda de um fotodocumentador pelo programa Loccus Biotecnologia – Lpix Image. As amostras foram mantidas no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a sua conservação.



**Figura 7** – Representação esquemática dos equipamentos utilizados para a corrida eletroforética em gel de agarose em sistema vertical. **Fonte:** Corrêa & Pussik (2016)

#### 4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para avaliação da comunidade de Arqueas do solo, os extratos de DNA das amostras de solo foram submetidos à reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com base no protocolo descrito por Hansel et al (2008). Esse procedimento foi

executado no laboratório de Fitopatologia molecular, localizado no departamento de Fitopatologia do IB/UnB.

**Tabela 1** – Iniciadores empregados nas reações de PCR.

Iniciador	Sequência
<b>ArchamoA-F</b>	(5' STA ATG GTC TGG CTT AGA CG 3')
<b>Arch-amoaA-R</b>	(5' GGC GGC GCG CGC CCG CCC CGC CCC CGT CGC CCG CGG CCA TCC ATC CAT CTG TAT GT 3')

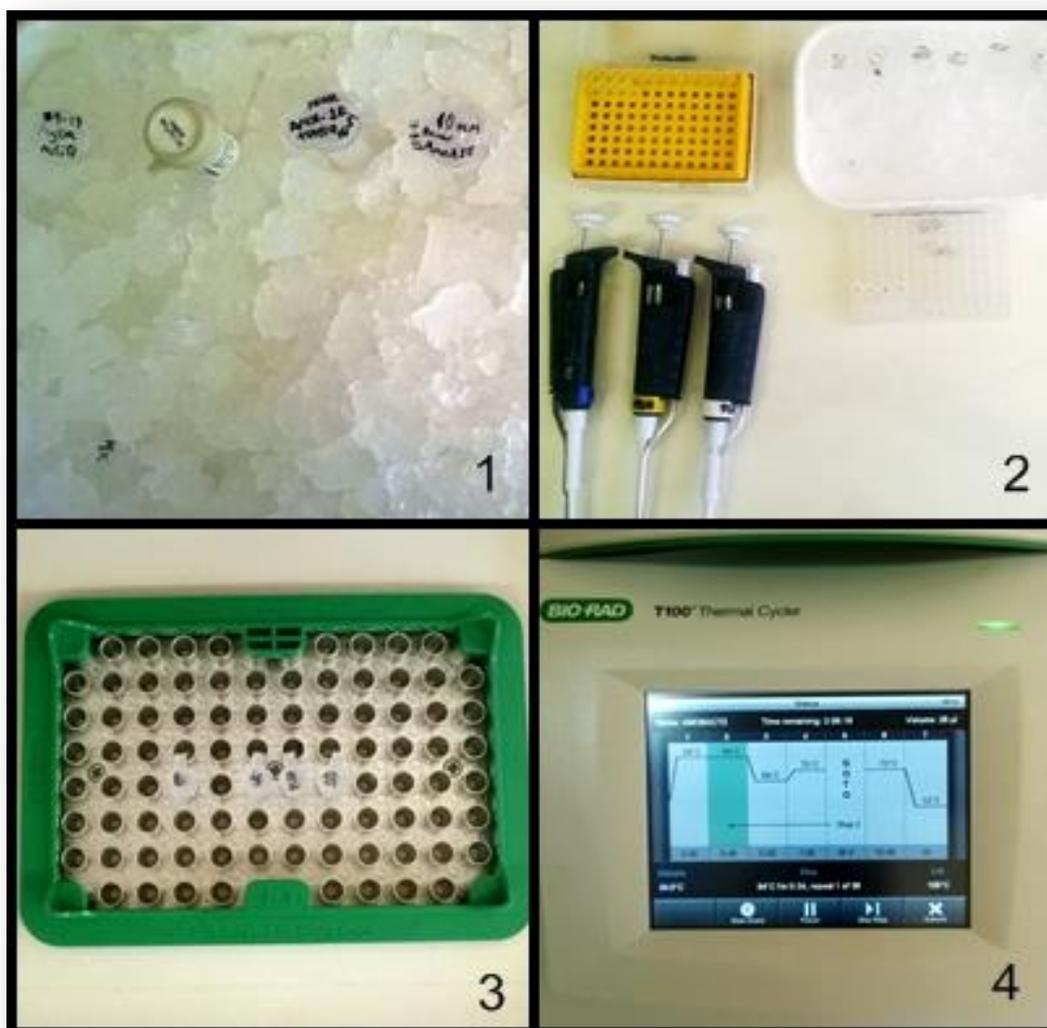
**Tabela 2** – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para cada amostra de DNA na reação de PCR.

Reagentes	Concentração	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água	-	35,6 $\mu\text{L}$
Tampão + $\text{MgCl}_2$ (promega)	(10 $\mu\text{M}$ )	5,0 $\mu\text{L}$
Primer (ArchAmoa-F)	(0,5 $\mu\text{M}$ )	2,5 $\mu\text{L}$
dNTPS	(10 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{L}$
Primer (Arch-Amoa-R)	(0,5 $\mu\text{M}$ )	2,5 $\mu\text{L}$
Bsa	(0,3mg/mL)	0,8 $\mu\text{L}$
TAQ (promega)	(5 U)	1,6 $\mu\text{L}$
DNA	-	1 $\mu\text{L}$
<b>Volume Final</b>	-	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>

A programação utilizada foi a seguinte: desnaturação inicial por 4 minutos a uma temperatura de 94°C, 30 segundos a 94°C e 30 segundos a 55°C, seguido por 38 ciclos, 72° C por 90 segundos para a etapa de anelamento e 72° em 10 minutos para a etapa de extensão.

**Tabela 3** – Programa da PCR.

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
4 minutos	94°C (desnaturação inicial)	} <b>38 ciclos</b>
30 segundos	94°C	
30 segundos	55°C	
90 segundos	72°C (Anelamento)	
10 minutos	72°C (Extensão)	



**Figura 8** - Etapas para a preparação da PCR. 1) Reagentes utilizados na preparação da reação; 2) Preparação da reação; 3) Mistura da reação (de reagentes) com os DNA's das amostras; 4) Programação no termociclador de acordo com o programa estabelecidos. **Fonte:** Autor.

**Tabela 4** – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para cada amostra de DNA na reação de PCR.

Reagentes	Concentração	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água	-	35,6 $\mu\text{L}$
Tampão + $\text{MgCl}_2$ (promega)	(10 $\mu\text{M}$ )	5,0 $\mu\text{L}$
Primer (ArchAmoa-F)	(0,5 $\mu\text{M}$ )	2,5 $\mu\text{L}$
dNTPS	(10 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{L}$
Primer (Arch-Amoa-R)	(0,5 $\mu\text{M}$ )	2,5 $\mu\text{L}$
Bsa	(0,3mg/mL)	0,8 $\mu\text{L}$
TAQ (promega)	(5 U)	1,6 $\mu\text{L}$
DNA	-	1 $\mu\text{L}$
<b>Volume Final</b>	-	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>

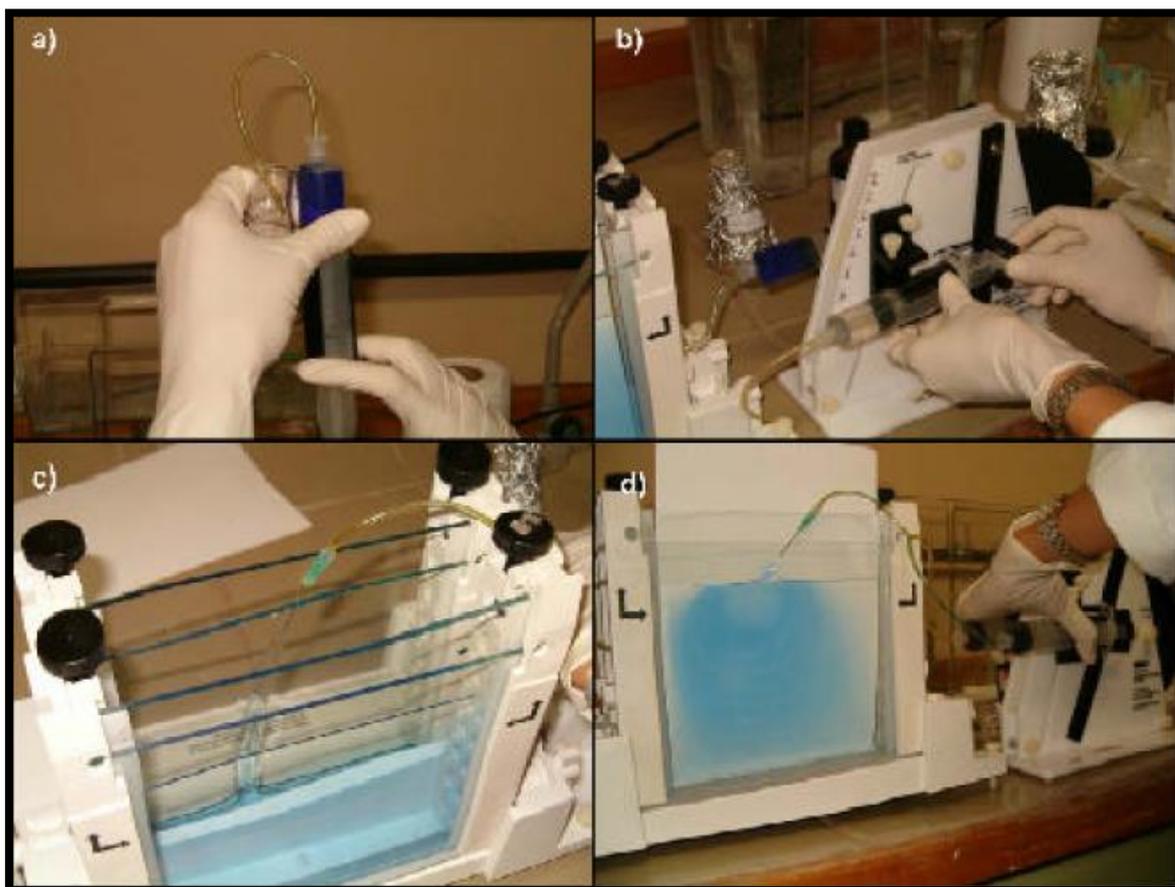
Para verificar a amplificação das PCR's, realizou-se uma corrida do produto em gel de agarose a 1,2 %. Ao gel adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em 5  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol, também adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  de marcador molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) para a verificação dos tamanhos das bandas geradas no gel.

A corrida dos produtos das PCR's no gel e a revelação dos géis foram realizadas sob o mesmo procedimento utilizado para a verificação da extração do DNA do solo.

#### 4.6 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O procedimento foi realizado no Laboratório de Ecologia de Ecossistemas do Departamento de Ecologia do IB/UnB. Os géis de poliacrilamida (acrilamida e bis-acrilamida) a 6% (w / v) foram preparados (Figura 9) com uma gradiente de desnaturação entre 35 e 55% (uréia-formamida), e os produtos de PCR foram aplicados em um volume de 30  $\mu\text{l}$  adicionados a 20  $\mu\text{l}$  de corante (2% de azul de

bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100%, água Milli-Q). A corrida do gel de DGGE foi realizada utilizando o sistema de eletroforese vertical, com uma voltagem constante de 60 V e temperatura de 55°C por um período de 18 horas em tampão 0,5X TAE. Uma pré-corrida de 1 hora foi realizada com os mesmos parâmetros para uma limpeza inicial do gel.



**Figura 9** – Preparação dos géis de poliacrilamida, e suas respectivas etapas de montagem. A) Preenchimento da seringa com a solução desnaturante; B) encaixe das seringas no aparelho que formará o gradiente; C) formação do gradiente desnaturante e D) formação do gradiente desnaturante. **Fonte:** Aboim et al (2004)

Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo ( $2\mu\text{g} / \text{mL}$ ) por 20 minutos, posteriormente, descorados em água destilada por 5 minutos. As bandas foram visualizadas em transiluminador U.V. com posterior fotografia do gel pelo programa Loccus Biotecnologia – Lpix Image. Para a construção do dendograma de

similaridade, foi utilizado o programa Bionumerics, construído a partir do índice de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

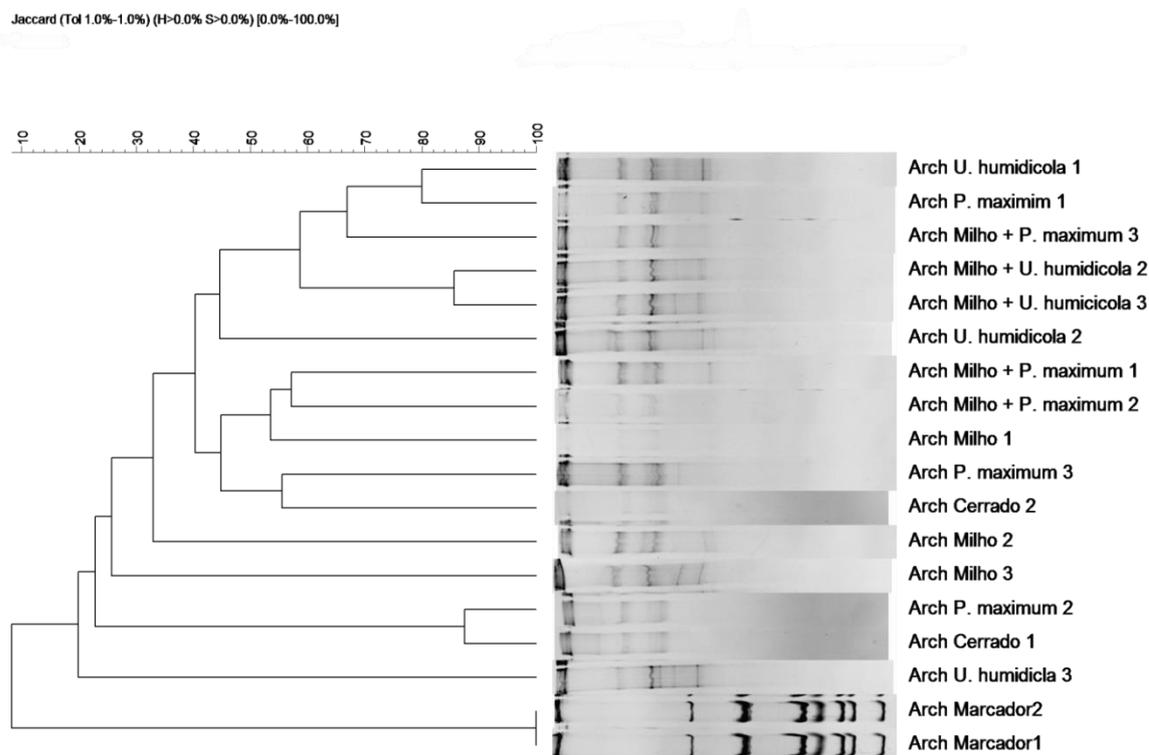
### 5.1 Estrutura da diversidade de Arqueas oxidantes de amônio (AOA) avaliada pela técnica de PCR-DGGE

Através da imagem gerada a partir do gel de DGGE, formou-se um dendograma de similaridade genética (Figura 10), utilizado para análise de similaridade entre os tratamentos e suas repetições. Considerando que em estudos de ecologia a variabilidade espacial pode influenciar a população microbiana do solo, cada repetição foi considerada como um tratamento independente.

As bandas representadas na figura 10 do dendograma em cada uma das amostras correspondem às Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's), sendo que cada unidade de banda corresponde a um táxon. Essas bandas fornecem uma ideia aproximada da comunidade e diversidade presente nas diferentes áreas de estudo, entretanto, não fornecem informações a respeito das espécies presentes em cada amostra.

Durante a etapa de PCR, não se obteve produto de PCR da amostra de milho em consócio com *U. humidicola* (R1), devido a não amplificação de seu produto, em função disso, inviabilizou-se a análise do mesmo durante a etapa de DGGE. Portanto, para este tratamento foram consideradas somente as amostras de milho em consócio com *U. humidicola* (R2 e R3).

A partir dos resultados obtidos através da técnica PCR-DGGE para análise da estrutura e diversidade da comunidade de Arqueas oxidantes de amônio (AOA) nos diferentes sistemas de manejos empregados, observou-se que a forrageira *U. humidicola* influenciou significativamente essa comunidade, visto que, maioria das áreas em monocultivo, e sob consorcio com o milho, apresentaram uma tendência na distribuição das bandas do DGGE, e conseqüentemente uma maior similaridade. Com uma ressalva para amostra em monocultivo (R3) de *U. humidicola*, que diferiu de todos os demais tratamentos.



**Figura – 10** Dendrograma de similaridade genética da comunidade de Bactérias nitrificantes do solo, construído a partir do índice de Jaccard. Método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos de diferentes sistemas de manejo em três repetições: milho em sistema de monocultivo (Repetição 1, 2 e 3); milho em consórcio com *P. maximum* cv. Aruana (R1, R2, R3); milho em consórcio com *U. humidicola* (R1, R2, R3); área sob pastagem *P. maximum* cv. Aruana ( R1, R2, R3); área sob pastagem *U. humidicola* (R1, R2, R3) e área nativa de Cerrado (R1 e R2), em solo Latossolo Vermelho distrófico típico no Cerrado, DF. **Fonte:** Autor.

Dentre os tratamentos avaliados neste experimento, os que apresentaram maior grau de similaridade representado no dendrograma de similaridade genética, encontram-se o milho em consorcio com a *U. humidicola* (R2 ) e (R3), apresentando um grau de similaridade superior a 85%. O *P. maximum* (R2) e a área de Cerrado (R1) foram os tratamentos que apresentaram maior grau de semelhança, aproximando-se dos 90% de similaridade, e estas se destacaram por apresentar um maior grau de dissimilaridade entre 20 e 30 % os tratamentos, com *P. maximum* em monocultivo (R2) juntamente a área de cerrado (R1) com as demais áreas avaliadas.

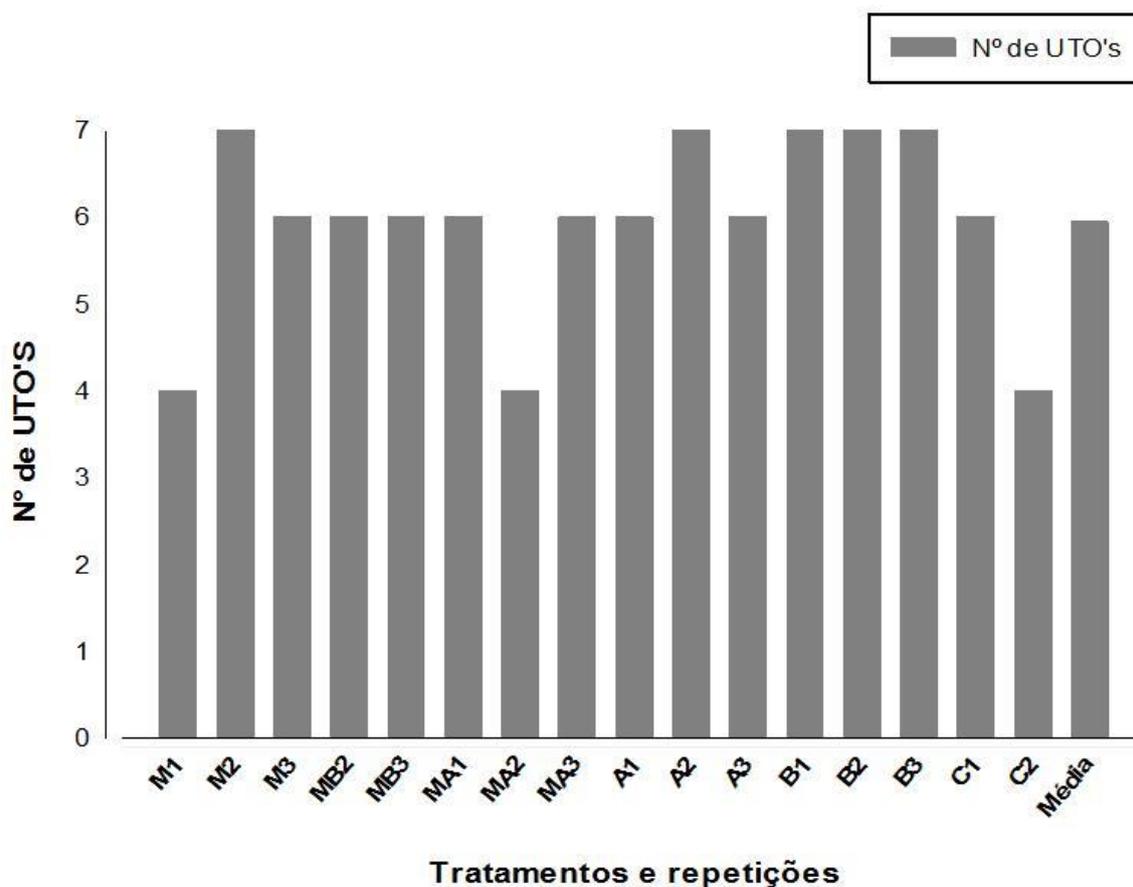
Nas dezesseis amostras analisadas, observou-se que houve uma variação entre 7 e 4 UTO's, demonstrando uma baixa variabilidade entre os tratamentos. Dentre os tratamentos com menor número de UTO's, o milho em monocultivo (R1), milho em consórcio com *P. maximum* (R2) e a área de cerrado (R2) apresentaram as menores números de UTO's, com 4 para cada um destes tratamentos. Em contrapartida, o milho em monocultivo (R2), o *P. maximum* (R2) e a *U. humidicola* (R1, R2 e R3) apresentaram 7 UTO's cada uma, respectivamente, podendo ser observadas na Figura 11.

Esse resultado indica que em termos de diversidade, as AOA não apresentam uma grande variabilidade entre os tratamentos, contudo, não é correto afirmar que estes apresentam uma estrutura semelhante, como se pode observar na Figura 8, isto pode estar associado ao fato de a AOA pertencerem ao domínio Archaea, caracterizado por microrganismos com habilidade de tolerar condições ambientais extremas e de alta resiliência (PAUL, 2007).

De acordo com SUBBARAO et al (2015), a maioria das espécies vegetais liberam compostos químicos através de seus sistemas radiculares que estimulam ou reprimem a atividade nitrificante. Essa informação será utilizada como base para alguns argumentos discutidos adiante.

Gramíneas como a braquiária e o capim colonião apresentam altas taxas de crescimento e são eficientes na absorção de amônio (NEILL et al., 1999; GARCIA-MONTIEL et al., 2001), isso auxilia na manutenção de AOA no solo, considerando que a população de AOA é negativamente influenciada por elevadas taxas de amônia no solo.

Nesse sentido, é possível que a braquiária beneficie a atividade nitrificante pelas AOA, uma vez que esta possui uma produção de fitomassa elevada, devolvendo o N ao solo gradativamente, regulando os teores de amônio, mas ao mesmo tempo fornecendo substrato para esse grupo.



**Figura – 11** Número de Unidades taxonômicas operacionais (UTO'S) nos diferentes sistemas de manejo. **Fonte:** Autor.

Byrnes et al (2017) em um estudo comparativo com as gramíneas forrageiras *Uruchloa humidicola* cv. Tuly (BT) e o híbrido interespecífico *Uruchloa mulato* (BM), encontraram diferenças na taxa de nitrificação e na comunidade nitrificante. Verificou-se que a população de AOA aumentou, e a taxa de nitrificação diminuiu, indicando que essa cultivar apresentou um efeito inibitório superior ao híbrido interespecífico *Uruchloa humidicola* cv. Tuly na atividade nitrificante das AOA, Condizente com os resultados aqui apresentados.

Considerando que os tratamentos em monocultivo e em consórcio com a *U. humidicola* apresentaram resultados semelhantes, pode-se inferir que *U. humidicola* por si só influencia na comunidade de AOA, entretanto é possível inferir que estas em consórcio podem influenciar na disponibilidade e na absorção de nitrogênio no milho (COSER et al., 2016).

A partir dessa afirmação é possível fazer uma relação, comparando com os resultados obtidos para o milho em monocultivo (R1) com o milho em consórcio com *U. Humidicola* (R1, R2 e R3). Observa-se uma diferença, mas ao mesmo tempo inconclusiva, uma vez que o milho em monocultivo (R2) é significativamente distinta, apresentando quase o dobro de UTO's que a R1.

Mao et al (2011) observaram que a cultura do milho diminuiu a população de AOA no solo, principalmente quando associada a adubação nitrogenada. O que poderia explicar nossos resultados, pois como observado, as doses de nitrogênio aplicadas na cultura do milho foram superiores as aplicadas nas forrageiras.

Os solos do cerrado apresentam baixa fertilidade, alto teor de alumínio e acidez elevada (RAIJ, 2011), além de apresentarem uma vegetação diferente das áreas antropizadas, considerando que a acidez interfere negativamente na atividade nitrificante do solo tanto pelo grupo de AOA, quanto para o grupo de AOB (NUGROHO., 2006; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), podemos inferir que nas amostras de cerrado, em parte, o baixo número de UTO's pode estar associado a essa condição. Contudo não é prudente afirmar com certeza essa hipótese, pois as duas amostras coletadas em diferentes áreas do cerrado apresentaram resultados distintos e, portanto, inconclusivos.

Em síntese, existem duas hipóteses que podem auxiliar na explicação do comportamento observado para as áreas de Cerrado avaliadas, e para o resultado do experimento como um todo. Primeiro, o número de amostras avaliadas, em especial da área de Cerrado pode não ser representativo da condição predominante no solo sob essa vegetação. Em segundo, em ecologia do solo tem-se a formação de micro-sítios que representam um nicho ecológico específico, sendo possível considerar então, cada amostra representativa de uma condição única. (PAUL, 2014; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006)

A atividade nitrificante do solo pelas AOA e AOB também podem mudar durante diferentes estações do ano (TAYLOR et al., 2012), fazendo-se necessário a coleta de material em diferentes estações, e considerando que nesse experimento as amostras foram coletadas durante o período de chuvas, seria necessário outra coleta no período seco.

Portanto, o uso de manejos que visem o consórcio, e/ou a cobertura do solo com gramíneas forrageiras como a braquiária, modificam a comunidade de AOA do solo, e conseqüentemente modificam a atividade nitrificante desse grupo, podendo interferir em processos como a desnitrificação, lixiviação de nitrogênio, além da emissão de gases do efeito estufa, como o  $N_2O$ .

## 7 CONCLUSÕES

- A presença da gramínea forrageira *U. humidicola* alterou a comunidade de Arqueas oxidantes de amônio, tanto sob monocultivo, quanto sob consórcio com o milho, formando um grupo distinto das demais áreas avaliadas, com a exceção para a amostra de *U. humidicola* R3, que diferiu de todos os demais tratamentos.
- A fertilização nitrogenada na área de milho sob monocultivo pode ser considerado um fator que influenciou negativamente a comunidade de AOA do solo, em comparação as forrageiras.
- A baixa variabilidade na contagem de UTO's dos diferentes tratamentos pode estar associada às AOA pertencerem ao domínio Archaea, caracterizado por microrganismos com habilidade de tolerar condições ambientais extremas e de alta resiliência.
- A área sob Cerrado (R1) apresentou uma variabilidade no número de UTO's e certa dissimilaridade em relação a área (R2), sugerindo que as condições dos solos nem sempre são as mesmas, indicando a formação de microssítios nos diferentes tratamentos, que representam um nicho ecológico específico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOIM, M. C. R.; BARBOSA, J. C.; COUTINHO, H. L. Da. C., & Rosado, A. S. Avaliação da diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial). **Embrapa Solos-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

ALVARENGA, R. C.; CABEZAS, W. A. L.; CRUZ, J. C.; SANTANA, D. P. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informe Agropecuário - Belo Horizonte**, v. 22, n. 208, p. 25–36, 2001.

ALVARENGA, R.C.; COBUCCI, T.; KLUTHCOUSKI, K.; WRUCK, F. J.; CRUR, J.C.; GONTIJO NETO, M. M. Cultura do milho na integração lavoura-pecuária. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v. 27: p. 106-126. 2006.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; MERCANTE, F. M. Transformações do nitrogênio em rotações de culturas sob sistema plantio direto. In: Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária. **Fábio Martins Mercante (ed.)**. Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**. 2000.

ANDREOTE, Fernando Dini. **Estrutura e função do microbioma de solos brasileiros**. 2014. 143 p. (Tese de Doutorado) . Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2014 .

ARP, D. J.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; HOMMES, N. G. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. **Archives of microbiology**, v. 178, n. 4, p. 250-255, 2002.

BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 641-649, 1998.

BAYER, C.; FONTOURA S. M. V. Dinâmica do nitrogênio no solo, pré-culturas e o manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho em plantio direto. In:

FONTOURA, S. M. V.; BAYER, C. Manejo e fertilidade de solos em plantio direto. Guarapuava, PR. Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2006.

BREMMER, J.M.; BLACKMER, A.M. Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen, v. 199, n. 4326, p. 295-296, 1978.

CARDOSO, A. M., CLEMENTINO, M. B. M., MARTINS, O. B., VIEIRA, R. P., ALMEIDA, R. V., ALQUERES, S. M. C. & ALMEIDA, W. I. 2003. Archaea: potencial biotecnológico. **Rev. Biotechn. Ciência e Desenvol.** n. 30, p. 71-77, 2003.

CARDOSO, N. B. J. E; TSAI, M. S; NEVES, P. C. M. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, N. B. J. E. (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, SP:Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992 p. 33-39.

CARMO, F. F. do; FIGUEIREDO, C. C. de; RAMOS, M. L. G.; VIVALDI, L. J.; ARAÚJO, L. G. Frações granulométricas da matéria orgânica em latossolo sob 84 plantio direto com gramíneas. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 3, p. 420–431, 2012.

CENCIANI, Karina. Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação. 2007. Tese de doutorado. ESALQ. Piracicaba, 2007. 103p.

COSER, T. R.; FIGUEIREDO, C. C. De; RAMOS, M. L. G.; JANNUZZI, H.; 85 MARCHÃO, R. L. Recuperação de carbono obtida por três métodos em frações da matéria orgânica de Latossolo, sob consórcio milho-forrageiras, no Cerrado. **Bioscience. Journal**, v. 28, p. 91–97, 2012.

DAVIDSON, E. A. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. **Nature Geoscience**, v. 2, n. 9, p. 659-662, 2009.

De, C. M. I; DE, S. D. Martinhão Gomes; DOS REIS JUNIOR, Fábio Bueno. BIOINDICADORES DE QUALIDADE DE SOLO: DOS LABORATÓRIOS DE PESQUISA PARA O CAMPO. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 32, n. 1/2, p. 191-209, 2017.

De PAULA, Alessandra Monteiro. **Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado** 120p. Tese (Doutorado em Agronomia) – ESALQ, Piracicaba, SP, 2008.

DIAS, A. C. Transformações do nitrogênio. In: CARDOSO, N. B. J. E; ANDREOTE, F. D. 2 (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, Piracicaba: ESALQ Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016, p. 99-110

Dos REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. D. C., TEIXEIRA, K. D. S.; REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

Dos SANTOS FREITAS, D.; MARQUES, J. J.; PERLINGEIRO, C. A. G. Estudo da viabilidade de aproveitamento de CO<sub>2</sub> offshore visando à produção de ureia. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. 2006.

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B. Nitrogênio em cobertura na cultura do milho em preparo convencional e plantio direto consolidados. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63-70, 2012

FIETZ, C. R.; COMUNELLO, E.; CECCON, G.; FLUMIGNAN D. L.; SENTELHAS, P. C. Risco climático do consórcio milho com braquiária em Mato Grosso do Sul. In: CECCON, G. (Ed.). **Consórcio milho-braquiária**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 89-112.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Biochemistry**, London, v. 80, n. 6, p. 1579-1583, Mar. 1983.

FRANCIS, C. A.; ROBERTS, K. J.; BEMAN, J. M.; SANTORO, A. E.; OAKLEY, B. B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 41, p. 14683-14688, 2005.

GARCIA-MONTIEL, D.; STEUDLER, P. A.; PICCOLO, M. C.; MELILLO, J.; NEILL, C.; CERRI, C. C. Controls on soil nitrogen oxide emissions from forest and pastures

in the brazilian Amazon. *Global Biogeochemical Cycles*, New York, v. 15, n. 4, p. 1021 – 1030, 2001.

GOMES, M. A. F.; DE SOUZA, M. D.; BOEIRA, R. C.; DE TOLEDO, L. G.  
**Nutrientes vegetais no meio ambiente:** ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos. Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 18. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 50 p.

GRISI, B. M.; GRAY, T. R. G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana dos solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, p. 109-115, 1986.

HAHN, J.; CRUTZEN, P. J. The role of fixed nitrogen in atmospheric photochemistry. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 296, n. 1082, p. 521-541, 1982.

HANSEL, C. M; FENDORF, S; JARDINE, P. M; FRANCIS, C. A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

HANSEL, C. M.; FENDORF, S; JARDINE, P. M; FRANCIS, C. A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

HE, J. Z.; SHEN, J. P.; ZHANG, L. M.; ZHU, Y. G.; ZHENG, Y. M.; XU, M. G.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.

HUNGATE, B. A.; DUKES, J. S.; SHAW, M. R.; LUO, Y.; FIELD, C. B. Nitrogen and climate change. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1512-1513, 2003.

JARPA, M.; AGUILAR, A.; BELMONTE, M., DECAP, J.; ABARZÚA, M.; VIDAL, G. Determinación de la capacidad nitrificante de un sedimento marino proveniente de un centro de cultivo de salmones. **Interciencia**, v. 32, n. 10, 2007.

JIA, Z.; CONRAD, R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1658-1671, 2009.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba, Agronômica Ceres, 1985. 492p.

KOOPS, H. P.; PURKHOLD, U.; POMMERENING-ROSER, A.; TIMMERMANN, G.; WAGNER, M. (2006) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: **The Prokaryotes**. DWORKING, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, S.; SCHLEIFER, K. H.; STRACKEBRANDT, E. (eds). Heidelberg, Germany: Springer, 2006 p. 778–811.

KROEZE, C. Nitrous oxide and global warming. **Science of the total environment**, v. 143, n. 2-3, p. 193-209, 1994.

LAM, P.; JENSEN, M. M.; LAVIK, G.; MCGINNIS, D. F.; MÜLLER, B.; SCHUBERT, C. J.; KUYPERS, M. M. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7104-7109, 2007.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R. C.; VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; CARDOSO, E. J. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos Ci. Solo**, v. 4, p. 43-84, 2005.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G. W.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 806-809, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Diversidade procariótica: bactéria. **Microbiologia de brock**, v. 10, 2004.

MAGALHÃES, R. T. **Evolução das propriedades físicas e químicas de solos submetidos ao manejo pelo Sistema Barreirão**. 1997. 86 p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.

MAO, Y.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24750, 2011.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 1999.

MCLEOD, M. L.; CLEVELAND, C. C.; LEKBERG, Y.; MARON, J. L.; PHILIPPOT, L.; BRU, D.; CALLAWAY, R. M. Exotic invasive plants increase productivity, abundance of ammonia-oxidizing bacteria and nitrogen availability in intermountain grasslands. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 4, p. 994-1002, 2016.

MENDES, I. D. C. Bioindicadores De Qualidade De Solo : Bioindicadores De Qualidade De Solo : p. 185–203, 2015.

MÉNDEZ, Daniel Fernando Salas. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua relação com atributos do solo em área de milho sob monocultivo e em consórcio com forrageiras no Cerrado**. 2016. 106 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2016

MESQUITA, Vanessa Alvarenga. **Caracterização da diversidade microbiológica de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2011. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de Lavras, Lavras, 2011.

MOREIRA, F., CARES, J., ZANETTI, R., & STURMER, S. O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. **O ecossistema solo**. Lavras: UFLA, p. 13-20, 2013.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. In: MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. 2 Ed. **Transformações bioquímicas e ciclo dos elementos no solo**. Lavras, MG: UFLA, 2006. p. 313-404.

MOREIRA, J. A. A.; SILVA, S. C. da; STONE, L. F. Armazenamento de água em um Latossolo Vermelho distrófico no sistema integração agricultura pecuária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 15., 2007, Aracaju. **Efeito**

**da água na agricultura:** anais. Aracaju: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia: Embrapa Tabuleiro Costeiros, 2007.

MORO, E., CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S., CANTARELLA, H., LAMBAIS, M. R. Bactérias amonificantes e nitrificantes e teores de amônio e nitrato afetados por plantas de cobertura e fertilizantes nitrogenados. **Agrarian**, v. 9, n. 33, p. 210-218, 2017.

MUZILLI, O. A fertilidade do solo no sistema plantio direto: bases para o manejo sustentável. In: SIMPÓSIO SOBRE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS NO SISTEMA PLANTIO DIRETO, 1., 2000, Ponta Grossa. Anais... Ponta Grossa: Associação dos Engenheiros Agrônomos dos Campos Gerais, 2000. p. 1-17

NEILL, C.; PICOLLO, M. C.; MELILLO, J. M.; STEUDLER, P. A.; CERRI, C. C. Nitrogen dynamics in Amazon forest and pasture soils measured by  $^{15}\text{N}$  pool dilution. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p.567 – 572, 1999.

NETO, M. S.; PICCOLO, M. de C.; FILHO, S. de P. V.; FEIGL, B. J.; CERRI, C. C. Mineralização E Desnitrificação Do Nitrogênio No Solo Sob Sistema Plantio Direto. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 923–936, 2010.

NICOL, G. W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J. I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2966-2978, 2008.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 329-335, 2003

NUGROHO, R. A.; RÖLING, W. F. M.; LAVERMAN, A. M.; ZOOMER, H. R.; VERHOEF, H. A. Low nitrification rates in acid scots pine forest soil are due to pH-related factors. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 89-97, 2007

OCHOA, S. A.; DE LA VEGA, E. G.; MOORILLÓN, G. V. N. Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 3, p. 233-245, 2015.

OLIVEIRA, F.H.T.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; CANTARUTTI, R.B. e BARROS, N.F. Fertilidade do solo no sistema plantio direto. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 2, p.393-486, 2002.

PACIULLO, D.S.C.; AROEIRA, L.J.M.; ALVIM, M.J.; CARVALHO, M.M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.421-426, 2003.

PARK, H.D.; REGAN, J. M.; NOGUERA, D. R. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbal processes. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 1-2, p. 273-280, 2002.

PAUL, Eldor A. **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. Academic press, 2007.

PECHE FILHO, A. **Mecanização do sistema plantio direto**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_2/mecanizacao/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/mecanizacao/Index.htm)>. Acesso em: 4/12/2017

PELISSARI, C.; 2017. **Dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante em wetland construído vertical**. Tese (Doutorado) - Curso Doutorado em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PINTO, M. V; BRUNO, P. I; van Lier, Q. D. J., Neto, D. D., & Reichardt, K. Uso excessivo de nitrogênio gera perda monetária para cafeicultores do cerrado baiano. **Coffee Science**, v. 12, n. 2, p. 29-39, 2017.

PINTO, Victor Meriguetti. **Simulation of water and nitrogen dynamics in a Cerrado soil under coffee cultivation using SWAP and ANIMO models**. 2015. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2015.

PRATHER, M. J.; HOLMES, C. D.; HSU, J. Reactive greenhouse gas scenarios: Systematic exploration of uncertainties and the role of atmospheric chemistry. **Geophysical Research Letters**, v. 39, n. 9, 2012.

PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 11, p. 523-531, 2012.

POSSIK, Patrícia Abrão. A análise de DNA por eletroforese. 2016. Disponível em: [ciencianews.com.br](http://ciencianews.com.br). Acesso em: 10/12/2017.

PURKHOLD, U. A.; POMMERENING-ROSER, A.; JURETSCHKO, S.; M. C.; SCHMID, M. C.; KOOPS, H. P.; WAGNER. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5368-5382, 2000.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo dos nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011

RAMOS, L. M. G.; KONRAD, M. L. D. F.; SILVA, D. E.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; BATISTA, L. M. T. Diversidade de fungos micorrízicos e colonização radicular, em forrageiras solteiras e em consórcio com milho. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 235–244, 2012.

DOS REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. D. C.; TEIXEIRA, K. D. S.; REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

MOTA, M. R.; SANGOI, L.; SCHENATTO, D. E.; GIORDANI, W.; BONIATTI, C. M.; DALL'IGNA, L. Fontes estabilizadas de nitrogênio como alternativa para aumentar o rendimento de grãos e a eficiência de uso do nitrogênio pelo milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 512-522, 2015.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SATO, J. H.; FIGUEIREDO, C. C. De; LEÃO, T. P.; RAMOS, M. L. G.; KATO, E. Matéria orgânica e infiltração da água em solo sob consórcio milho e forrageiras.

**Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 189–193, 2012.

SÁYER, Sandra Milena González. **Evaluación de comunidades microbianas edáficas oxidantes del amonio durante un ciclo de cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*)** 2012. 86 p. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.

SCHAUSS, K.; FOCKS, A.; LEININGER, S.; KOTZERKE, A.; HEUER, H.; THIELEBRUHN, S.; MUNCH, J. C. (2009). and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 446-456, 2009.

SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. Processos de eliminação de nitrogênio in tratamento biológico de águas residuárias. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J.; BERTOLA, N.C.; CONTRERAS, E.M. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Florianópolis: Gráfica PaperPrint, 2007, 449-508.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília, Empresa de Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1994. 142p

SMITH, K. A.; MCTAGGART, I. P.; TSURUTA, H. Emissions of N<sub>2</sub>O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. **Soil use and management**, v. 13, n. s4, p. 296-304, 1997.

STEPHEN, J. R.; MCCAIG, A. E.; SMITH, Z.; PROSSER, J. I. EMBLEY, T. M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4147-4154, 1996.

STEVENSON, F. J.; FITCH, A. Chemistry of complexation of metal ions with soil solution organics. **Interactions of soil minerals with natural organics and microbes**, n. interactionsofs, p. 29-58, 1986.

SUBBARAO, G. V.; YOSHIHASHI, T.; WORTHINGTON, M.; NAKAHARA, K.; ANDO, Y.; SAHRAWAT, K. L.; BRAUN, H. J. Suppression of soil nitrification by plants. **Plant Science**, v. 233, p. 155-164, 2015

SUDO, A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D. A. **Cultivo consorciado de cenoura e alface sob manejo orgânico**. EMBRAPA-CNPAB, 1998.

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

TAYLOR, A. E.; ZEGLIN, L. H.; WANZEK, T. A.; MYROLD, D. D. Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations and contributions to soil nitrification potentials. **The ISME journal**, v. 6, n. 11, p. 2024-2032, 2012.

TEIXEIRA, I. R.; MOTA, J. H.; SILVA, A. G. Consórcio de hortaliças. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 507-514, 2005.

THION, C. E.; PORIEL, J. D.; CORNULIER, T.; De VRIES, F. T.; BARDGETT, R. D.; PROSSER, J. I. Plant nitrogen-use strategy as a driver of rhizosphere archaeal and bacterial ammonia oxidiser abundance. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 7, 2016.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil. Biol. Biochem**, v. 12, p. 15-21, 1980.

TORSVIK, V. et al. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 64, n. 1, p. 53-62, Sept. 1998.

TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W.; CESAR, V. A.; GAVA, G.J.C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 193-201, 2002.

TUBIELLO, F. N.; SALVATORE, M.; ROSSI, S.; FERRARA, A.; FITTON, N.; SMITH, P. The FAOSTAT database of greenhouse gas emissions from agriculture. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 015009, 2013.

VALADARES, R. B. D. S; MESCOLOTTI, D. L. C; CARDOSO, N. B. J. E Micorrizas. In: CARDOSO, N. B. J. E; ANDREOTE, F. D. 2 (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, Piracicaba: ESALQ Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016, p. 1-179-196.

VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 1997. 524p.

VICTORIA, L. R.; PICCOLO, C. M.; VARGAS, T. A. A. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, N. B. J. E. (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, SP:Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992 p. 105-120.

VIEIRA, C. Cultivos consorciados. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 523-558.

WRAGE, N.; VELTHOF, G. L.; VAN BEUSICHEM, M. L.; OENEMA, O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. **Soil biology and Biochemistry**, v. 33, n. 12, p. 1723-1732, 2001.

WARD, B. B. 1986. Nitrification in marine environments. pp. 157- 184. J. I. PROSSER, J. I. (ed.). **Nitrification. Special publications of the Society for General Microbiology**, Vol. 20, IRL. Press, Oxford. UK.

WARD, B. B.; O'MULLAN, G. D.; Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a marine ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4153-4157, 2002.

WECHTER, P. et al. A rapid, cost-effective procedure for the extraction of microbial DNA from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 85-91, Dec. 2003.

WHEELIS, M. L.; KANDLER, O.; WOESE, Carl R. On the nature of global classification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 7, p. 2930-2934, 1992.

WHITTAKER, Robert H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150-160, 1969.

WUCHTER, C.; ABBAS, B.; COOLEN, M. J. L.; HERFORT, L.; VAN BIEIJSWIJK, J.; TIMMERS, P.; SCHOUTEN, S. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12317-12322, 2006.

XIA, W.; ZHANG, C.; ZENG, X.; FENG, Y.; WENG, J.; LIN, X.; JIA, Z. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. **The ISME journal**, v. 5, n. 7, p. 1226-1236, 2011.

ZHANG, L. M.; OFFRE, P. R.; HE, J. Z.; VERHAMME, D. T.; NICOL, G. W.; PROSSER, J. I. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17240-17245, 2010.

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