

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
CAMPUS DE FERNANDÓPOLIS - SP**

LUCIANO RICARDO DE OLIVEIRA

**USO DE eDNA PARA BIOANÁLISE DA QUALIDADE DO SOLO E
GESTÃO DE ECOSISTEMAS CANAVIEIROS PAULISTAS**

**USE OF eDNA FOR SOIL QUALITY BIOANALYSIS AND
MANAGEMENT OF PAULISTA SUGARCANE ECOSYSTEMS**

Fernandópolis – SP

2024

PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

LUCIANO RICARDO DE OLIVEIRA

**USO DE eDNA PARA BIOANÁLISE DA QUALIDADE DO SOLO E
GESTÃO DE ECOSISTEMAS CANAVIEIROS PAULISTAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete
Orientador

Prof. Dr. Luiz Sergio Vanzela
Co-orientador

Profa. Dra. Gisele Herbst Vazquez
Co-orientadora

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

Oliveira, Luciano Ricardo de.

O48e Uso de eDNA para bioanálise da qualidade do solo e gestão de ecossistemas canavieiros paulista. Luciano Ricardo de Oliveira – Fernandópolis SP: Universidade Brasil, 2024.

50f.; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete.

1. DNA ambiental 2. Genes microbianos 3. Desnitrificação 4. Enzimas do solo qPCR. I.Título.

CDD 571,630



TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANO RICARDO DE OLIVEIRA

**“USO DE eDNA PARA BIOANÁLISE DE QUALIDADE DO SOLO E GESTÃO DE
ECOSSISTEMAS CANAVIEIROS PAULISTAS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete – Presidente Orientador
(Universidade Brasil)



Prof^ª. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani
(Universidade Brasil)



Prof^ª. Dra. Raffaella Rossetto
(IAC - Campinas)

Fernandópolis/SP, 26 de julho de 2024
Presidente da Banca Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "USO DE eDNA PARA BIOANÁLISE DE QUALIDADE DO SOLO E GESTÃO DE ECOSISTEMAS CANAVIEIROS PAULISTAS"

Autor(es):

Discente: Luciano Ricardo de Oliveira

Assinatura: 

Orientador: Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete

Assinatura: 

Data: 26/07/2024

DEDICATÓRIA

A Deus, por me dar forças e sabedoria para superar os desafios ao longo desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete, pela orientação, paciência e apoio constante.

À minha querida esposa e aos meus filhos, pela compreensão, incentivo e amor incondicional, que foram fundamentais para a conclusão desta dissertação.

Aos meus pais, por terem sempre acreditado em mim e me incentivado a seguir os meus sonhos.

A todos os amigos e colegas, em especial a Debora, Acacio e Livia que estiveram ao meu lado, oferecendo apoio e encorajamento nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus por me dar força e perseverança para concluir esta pesquisa.

Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete, por sua orientação incansável, apoio constante e valiosas contribuições ao longo do desenvolvimento desta pesquisa de mestrado.

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Brasil, em nome do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, por proporcionar um ambiente acadêmico estimulante e recursos essenciais para a realização desta pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo (Proc. 2022/04436-7), que foi fundamental para a execução desta pesquisa de mestrado.

Minha sincera gratidão à minha esposa e aos meus filhos pelo incentivo inabalável e pelo apoio incondicional. Sem vocês, esta jornada não teria sido possível.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, meu muito obrigado.

RESUMO

A definição e monitoramento de variáveis da qualidade do solo são fundamentais para a produção primária sustentável de cana-de-açúcar utilizada em processos industriais de base biológica. Este estudo buscou avaliar o uso de DNA ambiental (eDNA) para biomonitorar a qualidade de solos canavieiros do Estado de São Paulo manejados com vinhaça (V), torta de filtro (T) e adubação mineral (AM). Amostras compostas de solo foram coletadas seguindo o esquema amostral: 2 classes de solo (Latossolo e Argissolo) x 2 texturas (argiloso e arenoso) x 3 sistemas de manejo (vinhaça, vinhaça combinada com torta de filtro, e adubação mineral) x 3 talhões x 2 períodos sazonais (chuvoso e seco). Com base na determinação da matéria orgânica (MO), carbono orgânico (COS), macro e micronutrientes, as amostras de Latossolo e Argissolo revelaram grupos claramente separados (R global = 0,554) em função do manejo agrícola, e grupos com alguma sobreposição em função da textura do solo (R global = 0,369). O número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*, quantificado pela técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) a partir do DNA genômico isolado das 72 amostras de solo foi maior no período chuvoso em comparação com o período seco ($P > 0,05$). Nenhum dos genes avaliados revelou resposta consistente aos diferentes manejos de solo da cana-de-açúcar, mostrando um padrão de resposta para cada classe e textura de solo. A atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase foi compatível com o manejo agrícola do solo de cana-de-açúcar, aumentando consistentemente na seguinte ordem: vinhaça < adubo mineral < vinhaça + torta de filtro, exceto Argissolo arenoso. Esse aumento foi mais acentuado no Latossolo do que no Argissolo, onde a média de vinhaça + torta de filtro e adubo mineral apresentou 1,8 (solo arenoso) e 3,9 (solo argiloso) vezes mais atividade do que no solo manejado com vinhaça. Análises estatísticas revelaram correlações negativas ($P < 0,05$) entre o número de cópias dos genes *nirK* e *nosZ* e a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase no solo em ambos os períodos sazonais analisados. O número de cópias destes dois genes microbianos também foi negativamente correlacionado com o teor de MO do solo no período chuvoso. Dessa forma, as indicações de solo canavieiro saudável baseadas em análises enzimáticas e na MO foram reforçadas pela menor abundância de genes associados com a desnitrificação, permitindo, indiretamente, que a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase revelasse, também, acerca do potencial de produção de óxido nitroso nos solos canavieiros analisados. Os resultados desta pesquisa reforçam a sensibilidade da bioanálise enzimática de qualidade do solo e ampliam o potencial da sua interpretação de qualidade ambiental em solos canavieiros paulistas.

Palavras-chave: DNA ambiental, Genes microbianos, Desnitrificação, Enzimas do solo, qPCR

ABSTRACT

Defining and monitoring soil quality parameters are essential for the sustainable production of sugarcane used in bio-based industrial processes. This study evaluated the use of environmental DNA (eDNA) to biomonitor the quality of sugarcane soils in São Paulo, Brazil, managed with vinasse (V), filter cake (C), and mineral fertilizer (MF). Composite soil samples were collected using a systematic arrangement: 2 soil classes (Ferralsol and Acrisol), 2 textures (clayey and sandy), 3 management systems (vinasse, vinasse combined with filter cake, and mineral fertilization), 3 plots, and 2 seasonal periods (rainy and dry), totaling 72 samples. Analysis of organic matter (OM), soil organic carbon (SOC), and macro- and micronutrients differentiated the Ferralsol and Acrisol samples into distinct groups based on agricultural management (Global R = 0.554) and showed some overlap based on soil texture (Global R = 0.369). The quantity of *nirK*, *nirS*, and *nosZ* gene copies, determined by Real-Time Quantitative PCR (qPCR) from genomic DNA isolated from the 72 samples, was higher in the rainy season compared to the dry season ($P > 0.05$). None of the genes evaluated revealed a consistent response to different sugarcane soil managements, showing a response pattern for each soil class and texture. The activity of β -glucosidase and arylsulfatase enzymes was consistent with the agricultural management of the sugarcane soil, consistently increasing in the following order: vinasse < mineral fertilizer < vinasse + filter cake, except for sandy Acrisol. This increase was more pronounced in Ferralsol than in Acrisol, where the average for vinasse + filter cake and mineral fertilizer presented 1.8 (sandy soil) and 3.9 (clayey soil) times more activity than in the soil managed with vinasse. Statistical analyses revealed negative correlations ($P < 0.05$) between the number of copies of the *nirK* and *nosZ* genes and the activity of the β -glucosidase and arylsulfatase enzymes in the soil in both seasonal periods analyzed. The number of copies of these two microbial genes was also negatively correlated with the soil OM content in the rainy season. Thus, the indications of healthy sugarcane soil based on enzymatic analyses and OM were reinforced by the lower abundance of genes associated with denitrification, indirectly allowing the activity of the β -glucosidase and arylsulfatase enzymes to also reveal the potential for nitrous oxide production in the sugarcane soils analyzed. The results of this research reinforce the sensitivity of enzymatic bioanalysis for soil quality and expand the potential for its interpretation of environmental quality in sugarcane soils in São Paulo.

Keywords: Environmental DNA, Microbial genes, Denitrification, Soil enzymes, qPCR

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Esse estudo teve como objetivo avaliar o uso de DNA ambiental (eDNA) para biomonitorar a qualidade de solos canavieiros do Estado de São Paulo manejados com resíduos da produção de etanol e açúcar (vinhaça e torta de filtro) e adubação mineral. O trabalho utilizou diferentes técnicas analíticas (análises químicas, enzimáticas e moleculares do solo e estatística) e mostrou que as indicações enzimáticas de solo canavieiro saudável são reforçadas pela menor abundância de genes microbianos associados com o processo de desnitrificação, permitindo, indiretamente, inferir sobre o potencial de produção de óxido nitroso (gás causador de efeito estufa) a partir dos solos canavieiros analisados. Os resultados desta pesquisa reforçam a sensibilidade da bioanálise enzimática de qualidade do solo e ampliam o potencial da sua interpretação de qualidade ambiental em solos canavieiros paulistas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização de talhões pertencentes a unidades produtoras com plantios comerciais de cana-de-açúcar na região Noroeste Paulista utilizados para amostragem do solo	27
Figura 2 – Esquema representativo da disposição dos pontos de coleta de solo em cada talhão amostrado nesse estudo. O espaçamento entre cada ponto de coleta foi de aproximadamente 50 metros	28
Figura 3 – Sequência fotográfica das etapas envolvidas na coleta de amostras de solo nos talhões comerciais avaliados no âmbito desse estudo. A – Tubo de PVC utilizado para coleta de solo, marreta de borracha e recipiente para transporte do solo; B – ponto de coleta; C – retirada de porção de solo para análise química; D – retirada de porção de solo para análises moleculares	28
Figura 4 – Amostras de solo para fins de análises moleculares (A) e químicas (B)	29
Figura 5 – <i>Heatmap</i> com base na matriz de correlação com o teor de matéria orgânica do solo, atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase e número de cópias dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> . de acordo com valores significativos ($P < 0,05$) do coeficiente de correlação de Spearman realizado em ambiente R com pacote “Hmink and CorrPlot”. Cores frias representam correlação positiva e cores quentes representam correlações negativas.....	43
Figura 6 – Correlação entre o número de cópias dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> e a atividade das enzimas arilsulfatase e β -Glicosidase nos períodos seco e chuvoso.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informação sobre os <i>primers</i> que foram utilizados para quantificação do número de cópias de genes funcionais relacionados ao processo de desnitrificação	32
Tabela 2 – Fatores químicos do solo coletado no período chuvoso na camada 0-20 cm nas áreas de estudo sob Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso	36
Tabela 3 – Fatores químicos do solo coletado no período seco na camada 0-20 cm nas áreas de estudo sob Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso	37
Tabela 4 – Número de cópias dos genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> e <i>nosZ</i> determinado por PCR quantitativo em tempo real a partir de amostras de solo coletadas em período chuvoso e seco	39
Tabela 5 – Atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase nos solos canavieiros com fertilizantes orgânicos e minerais nos períodos chuvoso e seco.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 USO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR	20
3.2 MANEJO AGRÍCOLA DE SOLOS CANAVIEIROS: IMPACTOS NAS FORMAS DE VIDA PRESENTES NO SOLO.....	22
3.3 MÉTODOS PARA IDENTIFICAR BIOINDICADORES DE MANEJO SUSTENTÁVEL PARA CULTURAS BIOENERGÉTICAS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 ÁREAS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DO SOLO	26
4.2. ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO.....	30
4.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DO SOLO.....	30
4.4. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	31
4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SOLO.....	32
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. AVALIAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS DO SOLO.....	34
5.2. NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>nirK</i> , <i>nirS</i> E <i>nosZ</i>	38
5.3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS β -GLICOSIDASE E ARILSULFATASE	40
5.4. CORRELAÇÃO ENTRE GENES FUNCIONAIS, ENZIMAS DO SOLO E MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO.....	42
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é cultivada em quase todas as regiões agrícolas brasileiras. No primeiro corte, que corresponde à chamada cana-planta, a produtividade média é de 82,4 t ha⁻¹, e após o primeiro corte, correspondente à chamada cana-soca (80% das áreas canavieiras no Brasil), a produtividade média é de 68,7 t ha⁻¹ (UNICA, 2019). A região Sudeste é a maior produtora com 61,3% (5.114,7 mil hectares), com grande concentração da produção no Estado de São Paulo (Conab, 2023). O setor sucroalcooleiro é parte importante do agronegócio brasileiro, além de ser referência internacional, respondendo pela principal destinação da cultura de cana-de-açúcar no Brasil.

Rendimentos elevados na produção de açúcar e álcool foram alcançados com a disponibilização de variedades de cana-de-açúcar resistentes às pragas e adaptadas às condições edafoclimáticas regionais, em combinação com medidas agronômicas que incluem altas taxas de aplicação de fertilizante nitrogenado (CANTARELLA et al., 2007), micronutrientes (MELLIS et al., 2016), adubação complementar com rochagem (BRITO et al., 2019), manutenção dos restos da cultura canavieira na superfície do solo (FURLANI NETO, 1994) e utilização dos resíduos da própria indústria, tais como a vinhaça e a torta de filtro (ORLANDO FILHO et al., 1983; ROSSETTO, 1987).

A vinhaça é um subproduto da indústria sucroalcooleira obtido em grandes quantidades e é composta por água, matéria orgânica e elementos minerais (HIDALGO, 2009). Desde a década de 1960, a vinhaça tem sido utilizada como fertilizante líquido nas lavouras de cana-de-açúcar do Brasil para reduzir o uso de fertilizantes minerais e resolver o problema ecológico de seu descarte no meio ambiente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A vinhaça é capaz de fornecer todo o potássio (K) e parte do nitrogênio (N) necessários para a cultura canavieira, sendo pobre em fósforo (P). De acordo com a norma técnica CETESB P4.231 de 2005, que define os critérios e procedimentos para aplicação de vinhaça em solo agrícola, a dosagem de aplicação de vinhaça para fins de fertilidade do solo deve atentar-se à concentração máxima de potássio, não podendo exceder 5% da Capacidade de Troca Catiônica (CTC).

Por sua vez, a torta de filtro é um composto orgânico, rico em P, e com expressivas quantidades de ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e cobre (Cu) (CERRI et al., 1988), derivado do processo de destilação/fermentação e da filtração a

vácuo do lodo retido nos clarificadores. A torta de filtro é aplicada a 10-30 t ha⁻¹ no sulco de plantio e 80-100 t ha⁻¹ na área total, em pré-plantio, substituindo parcial ou totalmente o fertilizante fosfatado, dependendo da dose de P₂O₅ recomendada.

Apesar da contribuição de tais medidas agronômicas para os rendimentos elevados na produção de açúcar e álcool no Brasil, e da regulamentação do uso da vinhaça no Estado de São Paulo pela Norma Técnica P 4.231, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2006), há uma preocupação de que a aplicação de vinhaça e torta de filtro em solos ao longo de diferentes ciclos da cultura canieira possa alterar o estado de qualidade do solo, principalmente devido ao acúmulo de K e metais pesados no solo e, conseqüentemente, declinar a produtividade de cana-de-açúcar e a sustentabilidade de agroecossistemas paulistas. Adicionalmente, sabe-se que o uso de fertilizantes minerais juntamente com compostos orgânicos potencializa as emissões de óxido nitroso (SOUZA NETO, 2012), um importante gás causador de efeito estufa.

Entende-se por qualidade do solo, a capacidade de um solo, dentro dos limites de seu ecossistema natural ou manejado, de sustentar a produtividade de plantas e animais, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar, garantindo a saúde e permitindo a habitação humana (DORAN e PARKIN, 1994). Nesse sentido, a finalidade de avaliação da qualidade do solo é fornecer informação necessária para proteger e melhorar a longo prazo a produtividade agrícola, a qualidade da água e os habitats de todos os organismos, incluindo as pessoas (KARLEN et al., 1997).

Embora haja consenso entre pesquisadores e agricultores de que a manutenção ou melhoria da qualidade do solo é um elemento-chave para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a avaliação dessa qualidade não é uma tarefa fácil. A multiplicidade de fatores químicos, físicos e biológicos que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações em função do tempo e espaço, aliados à complexidade do solo, estão entre os fatores que dificultam a capacidade de acessar a sua qualidade e identificar parâmetros-chave que possam servir como indicadores do seu funcionamento. Por essa razão, um conjunto mínimo de indicadores que englobam atributos físicos, químicos e biológicos deve ser utilizado nas análises de qualidade do solo (DORAN e PARKIN, 1994), uma vez que nenhum indicador individualmente irá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo.

No entanto, até o momento, a avaliação da qualidade do solo vem sendo feita principalmente com base em atributos químicos e físicos, uma vez que a porção biológica do solo costuma ser mais difícil de quantificar. Entretanto, quando se trata

da avaliação da qualidade e da sustentabilidade de solos agrícolas, é fundamental que esta seja feita também, e principalmente, com base em indicadores biológicos, os quais são sensíveis para detectar alterações na qualidade do solo mais precocemente que os indicadores químicos e físicos (SILVEIRA e FREITAS, 2007).

Os micro-organismos, juntamente com a fauna (micro, meso e macro) e as raízes das plantas, constituem a fração viva da matéria orgânica do solo e podem ser utilizados como indicadores biológicos ou bioindicadores, uma vez que estão intimamente relacionados ao funcionamento do solo, apresentando uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos. Os micro-organismos do solo, por exemplo, são responsáveis por serviços ambientais de importância fundamental, tais como os processos de formação do solo, decomposição de resíduos orgânicos (animais e vegetais), ciclagem de nutrientes e formação da matéria orgânica, biorremediação de poluentes e agrotóxicos, entre outros. A participação dos micro-organismos em todos esses processos justifica a inclusão dos indicadores microbiológicos nos índices de qualidade do solo e a necessidade de estudos visando selecionar quais desses indicadores microbiológicos seriam os mais apropriados para esse fim (MENDES et al., 2009).

Nesse sentido, vale ressaltar que métodos tradicionais envolvendo principalmente a avaliação da biomassa microbiana do solo, com sua atividade avaliada pela evolução de gás carbônico (CO₂) ou por enzimas presentes no solo, têm sido utilizados para avaliar os efeitos do manejo agrícola do solo em suas propriedades microbiológicas (VANCE et al., 1987; ZIBILSKÉ, 1994; MENDES et al., 2003, 2019). Porém, é importante destacar que a abundância e atividade dos micro-organismos são muito suscetíveis às variações sazonais, principalmente temperatura e umidade (ZILLI et al., 2003). Além disso, a biomassa microbiana fornece apenas uma estimativa quantitativa dos micro-organismos, não considerando a composição ou função das comunidades microbianas do solo. A combinação de métodos de biologia molecular, que tem favorecido o conhecimento acerca da composição das comunidades microbianas e suas funções no ambiente do solo, com os métodos tradicionais utilizados para avaliação microbiológica do solo, permite considerar informações quantitativas e qualitativas, taxonômicas e funcionais, acerca das comunidades microbianas presentes no solo. Tal combinação pode caracterizar um complemento aos métodos tradicionais para a avaliação da qualidade de solos agrícolas (NAVARRETE et al., 2015). Essa complementação é possível graças ao uso de métodos de bioinformática, desenvolvidos em parceria com a ciência da

computação, estatística, matemática e engenharias, capazes de analisar, interpretar e processar dados moleculares obtidos em larga escala, de modo a identificar grupos microbianos e suas atuações nos processos biológicos que ocorrem no solo e combinar informação da química, física e biologia do solo (NAVARRETE et al., 2021).

A combinação de informações acerca da microbiologia do solo, obtidas com o uso de métodos moleculares, com atributos químicos e físicos do solo, mediante utilização de bioinformática, tem revelado que mudanças nas comunidades microbianas do solo estão frequentemente correlacionadas com diferentes fatores físicos e químicos deste ambiente (FREY et al., 2004; NILSSON et al., 2007; LAUBER et al., 2008; JENKINS et al., 2009). Em particular, tem sido mostrado que grupos microbianos taxonômicos e funcionais se correlacionam com o pH do solo e com outros fatores químicos como a razão cálcio/magnésio (Ca/Mg) e teores de alumínio (Al), P e Zn (FIERER e JACKSON, 2006; HARTMAN et al., 2008; LAUBER et al., 2009; FAORO et al., 2010; NAVARRETE et al., 2017), bem como com a textura do solo (PEREIRA et al., 2013; CARBONETTO et al., 2014). Estas constatações foram feitas para a composição total de comunidades bacterianas, fúngicas e de *Archaea* presentes no solo e para a composição de grupos microbianos individuais a partir da análise de genes marcadores taxonômicos e funcionais (NICOL et al., 2008; DAVIS et al., 2009; BAKER et al., 2009; KURAMAE et al., 2011; NAVARRETE et al., 2013; 2017).

Técnicas moleculares como o PCR real time (do inglês, *Real Time - Polymerase Chain Reaction*), também denominada de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), são altamente sensíveis, precisas, seguras, rápidas e capazes de quantificar o número de cópias de genes-alvo no DNA total de amostras ambientais (WHITCOMBE et al., 1999). Wittwer *et al.* (2001) propuseram metodologia baseada na técnica de qPCR capaz de reunir alguns pares de iniciadores ao mesmo tempo e, assim, quantificar alguns pares de genes simultaneamente. Essa nova metodologia deu nome à técnica de PCR real-time multiplex (qPCR multiplex), a qual tem sido bastante utilizada em bioensaios de microbiologia clínica para a detecção de genes taxonômicos e funcionais capazes de diagnosticar doenças em humanos e animais (VIDIC et al., 2017; TOMBULOGLU et al., 2021).

Diante de tais considerações, o presente estudo focou em genes funcionais microbianos associados com o processo de desnitrificação, os quais foram reportados na literatura com sensibilidade às variações nas características do solo canavieiro com o manejo agrícola feito a partir da aplicação de fertilizantes minerais e orgânicos.

Assim, este estudo buscou-se confirmar a capacidade de tais genes indicar o estado específico de solos canavieiros manejados com vinhaça e torta de filtro, em plantios comerciais na região Noroeste Paulista, utilizando a técnica de qPCR. Para tanto, o número de cópias dos genes selecionados foi interpretado para as diferentes classes e texturas de solos paulistas sob sistemas de manejo canavieiro de forma comparada aos resultados da bioanálise desses solos com as enzimas β -glicosidase e arilsulfatase, segundo metodologia BioAS, e com os teores de matéria orgânica do solo, um importante indicador de qualidade do solo.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Melhorar a *performance* agroambiental de canaviais paulistas por meio da avaliação da qualidade do solo com base na correlação da abundância de genes funcionais microbianos, com a matéria orgânica e fatores minerais do solo e a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se solos canavieiros classificados como Latossolo e Argissolo, com textura arenosa e argilosa, diferem quanto aos fatores químicos em função do manejo agrícola (aplicação de vinhaça, torta de filtro e adubação mineral).
- Quantificar o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* a partir de amostras de Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso coletadas sob cultivo de cana-de-açúcar manejado com vinhaça, torta de filtro e adubação mineral em período seco e úmido no Estado de São Paulo, Brasil;
- Correlacionar o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*, o teor de matéria orgânica e carbono orgânico no solo e a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase determinada a partir de amostras de Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso coletadas sob cultivo de cana-de-açúcar manejado com vinhaça, torta de filtro e adubação mineral.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A avaliação da qualidade de solos agrícolas com o uso de diferentes metodologias é capaz de oferecer *insights* fundamentais para a compreensão de variáveis úteis para monitorar a saúde e produtividade do solo. Ao compreender e monitorar essas variáveis, é possível aprimorar estratégias de manejo e conservação do solo, garantindo sua capacidade contínua de sustentar ecossistemas agrícolas saudáveis e produtivos.

3.1 USO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA NA CULTURA DA CANA-DE-AÇUCAR

Conforme mencionado por Santiago (2022), no contexto da cana-de-açúcar, a aplicação de vinhaça e torta de filtro, que são subprodutos significativos da indústria canavieira, desempenha um papel crucial ao fornecer contribuições relevantes de matéria orgânica, potássio e fósforo, respectivamente.

Os subprodutos provenientes das usinas de açúcar e etanol, como a torta de filtro e a vinhaça, são valiosas fontes de fertilizantes orgânicos. Além disso, a adubação orgânica apresenta outros aspectos altamente benéficos, aproveitando resíduos cuja disposição inadequada poderia resultar em impactos ambientais. Outra vantagem notável desse método de adubação é sua durabilidade. O processo de absorção dos nutrientes orgânicos engloba etapas de decomposição e mineralização.

A torta de filtro surge como resultado da filtração do lodo gerado durante a fase de clarificação do caldo de cana. Sua composição química é variável, caracterizando-se por elevados teores de matéria orgânica e umidade, conferindo-lhe a qualidade de um resíduo com potencial para ser empregado como fertilizante no solo. Além disso, há a possibilidade de sua utilização na alimentação animal, conforme destacado por Rossetto (2004) e Rosset, Rampim, Schiavo (2015).

A vinhaça é o subproduto resultante da destilação do caldo de cana fermentado em destilarias ou do melaço fermentado para a produção de álcool, em destilarias associadas às usinas de açúcar. De acordo com Belhadj (2013), a composição da vinhaça consiste em uma mistura de água, compostos orgânicos e inorgânicos, com uma estrutura básica composta por 93% de fase aquosa e 7% de sólidos em suspensão (orgânicos e minerais) (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A vinhaça apresenta um elevado teor de potássio e nitrogênio, além de conter cálcio, magnésio,

fósforo e enxofre em concentrações menores (SEIXAS et al., 2016). Devido à presença de minerais e matéria orgânica, esse subproduto da produção de etanol é empregado como fertilizante agrícola (SILVESTRE, 2014).

Ao considerar a utilização de fontes de matéria orgânica, como a torta de filtro, cama de frango ou torta de mamona, destaco a importância de analisar seus componentes nutricionais. Notavelmente, a vinhaça desponta como uma escolha recomendável devido ao seu significativo teor de potássio (K) disponível. Em virtude desse elevado teor, é viável que todo o aporte de K necessário seja suprido pela vinhaça, permitindo, assim, uma redução correspondente na recomendação de adubação. Nesse contexto, é pertinente debitar 70% do nitrogênio (N) contido na vinhaça da recomendação total de adubação.

No caso da torta de filtro, é preciso salientar sua riqueza em fósforo (P), embora uma parte desse elemento apresente dificuldades de mineralização. Diante disso, propõe-se descontar 60% do P contido na torta de filtro da dose de adubação, juntamente com a dedução de 30% do N proveniente da mesma fonte.

Essas considerações, embasadas em análises detalhadas, proporcionam um direcionamento mais eficaz no manejo da adubação, maximizando os benefícios nutricionais dessas fontes orgânicas e otimizando a eficiência do processo agrícola.

No método de colheita da cana crua, ocorre o corte e deposição sobre a superfície do solo de folhas secas, ponteiros e folhas verdes, formando uma camada de cobertura morta. Este processo desencadeia modificações ambientais diversas no solo, conferindo-lhe benefícios notáveis. A cobertura morta resultante desempenha um papel crucial na proteção do solo contra a erosão, mantendo a umidade de maneira eficaz. Além disso, contribui para o aumento da atividade microbiana, promovendo processos biológicos benéficos ao ecossistema do solo. A presença dessa camada também propicia o enriquecimento em matéria orgânica, um fator que, por sua vez, exerce impacto positivo sobre os atributos físicos e químicos do solo, como observado em estudos anteriores (DALCHIAVON, 2012).

Os dados referentes à produção de palhada, conforme apresentados por Campos (2003), revelam que esta corresponde aproximadamente a 15% da produção total de matéria seca pela cultura da cana-de-açúcar. Este valor varia na faixa de 13 a 20 toneladas por hectare ao ano. Macedo e Nogueira (2004) destacam que, para cada tonelada de cana-de-açúcar (considerando apenas os colmos) colhida, são gerados 140 quilogramas de palha (matéria seca). Em relação às variedades cultivadas no Estado de São Paulo, com produtividade média de cana atingindo 82,4

toneladas por hectare, a produção de palha, em termos de base seca, atinge aproximadamente 14% do total (LAMÔNICA, 2005).

Estudos adicionais corroboram a influência da colheita da cana crua na produção de palha, estimando valores entre 10 e 20 toneladas por hectare de matéria seca (VITTI et al., 2011; MATSUOKA et al., 2012; VALE, 2013). Esses resultados evidenciam a relevância da avaliação dessas variáveis na compreensão da dinâmica ambiental associada à cultura da cana-de-açúcar, contribuindo para a formulação de práticas agrícolas mais sustentáveis.

A decomposição desse resíduo cultural no solo está sujeita à influência de variáveis ambientais, como temperatura, umidade e aeração. Além disso, fatores químicos desempenham um papel crucial, sendo esses influenciados, principalmente, pela qualidade dos resíduos culturais. Aspectos como a relação C/N, teores de lignina, celulose, hemicelulose e polifenóis são especialmente relevantes nesse contexto (KWONG et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2020).

3.2 MANEJO AGRÍCOLA DE SOLOS CANAVIEIROS: IMPACTOS NAS FORMAS DE VIDA PRESENTES NO SOLO

O solo é um ecossistema rico em vida. Dentre os organismos que habitam o solo, encontram-se representantes dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, além de fungos, algas, vírus, protozoários e uma ampla diversidade de seres pertencentes à fauna do solo, como colêmbolos, ácaros, nematoides, minhocas, formigas e insetos, que passam parte ou toda a sua vida no subsolo. Os microrganismos constituem uma parcela ínfima da massa do solo, ocupando menos de 1% do seu volume total. Apesar disso, essa pequena fração abriga uma biodiversidade imensa, concentrada principalmente na camada superficial do solo, situada a uma profundidade de 0 a 30 centímetros (NAVARRETE et al., 2022).

De acordo com Chaer e Tótola (2007), os parâmetros microbiológicos do solo desempenham um papel crucial na avaliação inicial de potenciais efeitos adversos do manejo sobre a qualidade do solo. Esse enfoque permite uma análise precoce para determinar se as práticas de manejo em curso contribuem para fortalecer ou comprometer a sustentabilidade dos sistemas de produção. Em consonância com diversas abordagens conceituais, a definição de qualidade do solo, conforme proposta por Vezzani e Mielniczuc (2009), se baseia na integração das propriedades biológicas,

físicas e químicas do solo, as quais possibilitam ao solo desempenhar suas funções no contexto do sistema solo-planta-atmosfera.

O acompanhamento da qualidade do solo em relação às práticas de manejo da cultura da cana-de-açúcar emerge como um aspecto fundamental para promover o desenvolvimento sustentável do sistema de produção nesse contexto agrícola. Esse monitoramento requer uma análise conjunta de fatores biológicos e químicos do solo, incluindo a microbiota do solo e as dinâmicas de entrada e saída de carbono e nitrogênio no solo. Esse enfoque integrado se revela essencial para compreender de maneira abrangente os impactos das práticas de manejo na saúde e na funcionalidade do solo, orientando decisões que visam otimizar a sustentabilidade e a eficiência do sistema de produção

Um desafio contemporâneo na agricultura consiste em incrementar a produção agrícola de maneira sustentável, visando alimentar a população global em constante crescimento sem causar impactos adversos ao meio ambiente. O microbioma vegetal, essencial para o desenvolvimento e a saúde das plantas, pode desempenhar uma função crucial na abordagem dessa questão (ZANCARINI et al., 2021).

As plantas podem ser colonizadas por diversas comunidades microbianas, as quais estão associadas à rizosfera, filosfera e, também, aos tecidos vegetais, conhecidos como endosfera, formando o complexo microbioma vegetal. Este microbioma desempenha um papel de extrema relevância na manutenção da saúde das plantas no ambiente. Sua contribuição é notável nos ciclos biogeoquímicos, na disponibilidade de nutrientes, na resiliência ao estresse e, por fim, na nutrição das plantas, conforme discutido por Busby et al. (2017).

3.3 MÉTODOS PARA IDENTIFICAR BIOINDICADORES DE MANEJO SUSTENTÁVEL PARA CULTURAS BIOENERGÉTICAS

Utilizando abordagens moleculares de *fingerprinting* da comunidade microbiana, Wallis et al. (2010) identificaram distintas estruturas de comunidades bacterianas em solos cultivados com cana-de-açúcar, especificamente entre áreas onde os resíduos da cultura foram mantidos na superfície e solos sujeitos ao manejo de colheita manual com queima. Rachid et al. (2012), por sua vez, aprofundaram essa análise, investigando os efeitos dos métodos de colheita manual com queima e colheita mecanizada sem queima nas comunidades bacterianas e fúngicas presentes no solo, bem como nos genes funcionais associados a essas comunidades.

Os resultados revelaram que a comunidade fúngica do solo demonstrou ser mais sensível às alterações nos níveis de retenção de resíduos da cultura na superfície do solo, sugerindo uma possível influência desses resíduos como substrato. Rachid et al. (2012) também observaram que as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana oxidadora de amônia (gene *amoA*) estavam correlacionadas com a razão C/N no solo. No entanto, correlações não significativas foram encontradas entre a estrutura da comunidade bacteriana desnitrificante (gene *nirK*) e os fatores químicos do solo.

Esses achados destacam a complexidade das interações entre a microbiota do solo e as práticas agrícolas, ressaltando a importância de considerar não apenas as comunidades microbianas, mas também os genes funcionais associados, ao avaliar o impacto do manejo na saúde e na funcionalidade do solo. Essa compreensão mais aprofundada pode contribuir significativamente para a formulação de estratégias de manejo mais refinadas e ecologicamente sustentáveis na cultura da cana-de-açúcar.

Dado que os microrganismos desempenham um papel crucial na mediação de processos biogeoquímicos essenciais para o ciclo global de nutrientes e a sustentabilidade dos ecossistemas, é de suma importância prática e científica compreender os efeitos dos sistemas de cultivo bioenergético sobre essas comunidades microbianas e suas funções no solo (FALKOWSKI, 2008).

Investigações moleculares, tais como impressão digital genética, metagenômica, metaproteômica, metatranscriptômica e proteogenômica, desempenham um papel crucial na identificação e caracterização da ampla diversidade e das funções dos microrganismos. Essas abordagens são essenciais para compreender as interações desses organismos com os fatores ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos (MENDES et al., 2017).

Métodos tradicionais na microbiologia do solo, como a avaliação da atividade enzimática e biomassa microbiana, frequentemente utilizados para analisar a qualidade do solo, têm sido empregados em conjunto com abordagens moleculares e químicas. Isso visa comparar as respostas de grupos microbianos taxonômicos e funcionais específicos, servindo como potenciais bioindicadores de impacto das práticas de manejo do solo em comunidades microbianas nos campos de produção de cana-de-açúcar (NAVARRETE et al., 2015).

Sob a perspectiva das interações solo-planta-microrganismos, observam-se exemplos de recrutamento de características microbianas benéficas na rizosfera (SOARES et al., 2016; LI et al., 2016). Pesquisas conduzidas por Souza et al. (2016)

mostraram que as comunidades microbianas, provenientes principalmente do solo nativo ao redor das plantas de cana-de-açúcar, colonizam os órgãos das plantas seguindo padrões distintos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DO SOLO

As áreas de estudo foram localizadas na região Noroeste Paulista, e foram identificadas junto a diferentes unidades sucroalcooleiras comerciais. Tal identificação foi feita com base em classificação pedológica realizada pelo Programa Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) sob a condução do pesquisador Hélio do Prado da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

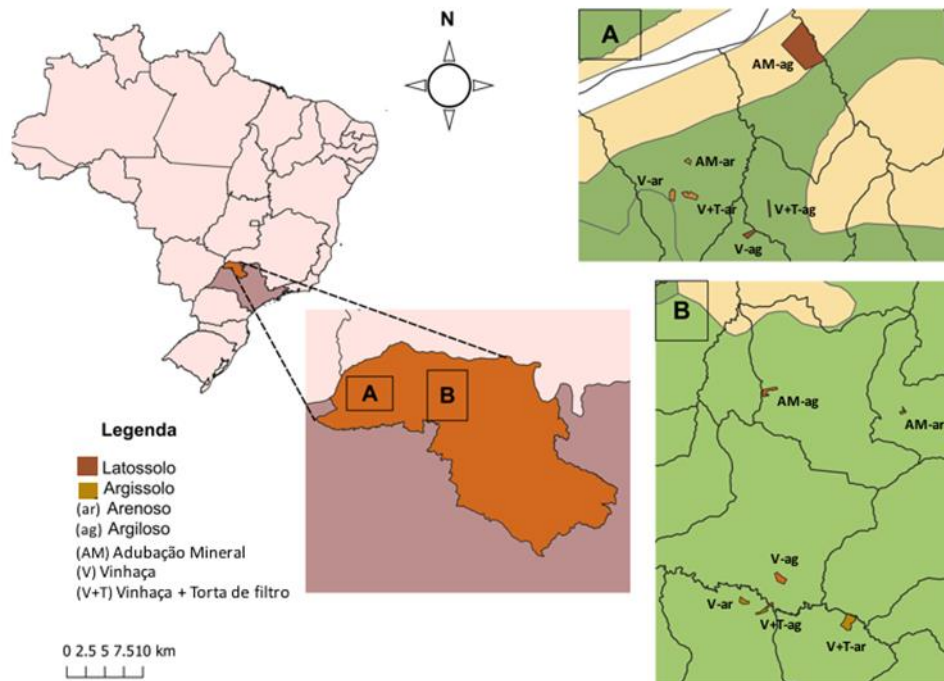
Segundo dados do IBGE-Produção Agrícola Municipal, 80% da área de plantações agrícolas da região Noroeste Paulista é ocupada com cana-de-açúcar (cerca de 1.040.000 hectares em 2021), sendo esta região conhecida como 'vale da cana-de-açúcar'. Os solos da região Noroeste Paulista são em sua maioria menos férteis em comparação com os solos de outras regiões do Estado de São Paulo, apesar de manchas com diferentes classes e texturas de solo serem facilmente encontradas nesta região sob cultivo de cana-de-açúcar. Assim, a região Noroeste Paulista reúne expressiva produção canavieira e classes e texturas de solos que podem ser encontradas em todo o Estado de São Paulo, sendo estes manejados, dentre outros fertilizantes, com vinhaça, torta de filtro e adubação mineral.

Mapa com a localização de talhões pertencentes às unidades produtoras com plantios comerciais de cana-de-açúcar na região Noroeste Paulista é apresentado abaixo para mostrar as áreas utilizadas para amostragem do solo no âmbito deste estudo (Figura 1).

Foram selecionadas duas unidades para condução desta pesquisa, sendo uma delas sediada em Santa Albertina, coordenadas latitude 20°2'31,21"S e longitude 50°40'42,91"O, e outra no município de Sebastianópolis do Sul, latitude 20°35'8,05"S e longitude 49°57'0,71"O, ambas no Estado de São Paulo.

Em cada uma das duas unidades produtoras comerciais de cana-de-açúcar foram selecionadas seis áreas de estudo (talhões) correspondentes aos diferentes cenários delineados para essa pesquisa, definidos com base em classes e texturas de solo e manejo agrícola do solo canavieiro.

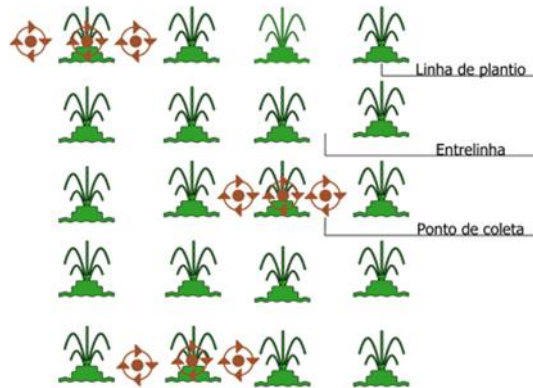
Figura 1 – Localização de talhões pertencentes a unidades produtoras com plantios comerciais de cana-de-açúcar na região Noroeste Paulista utilizados para amostragem do solo no âmbito desse projeto de pesquisa



Fonte: Autoria própria.

Em cada um dos doze talhões a amostragem do solo foi realizada sob a orientação de um delineamento inteiramente casualizado, porém, respeitando a metodologia para obter três amostras na linha de plantio e seis amostras nas entrelinhas em três diferentes pontos amostrais em cada talhão (Figura 2). Em seguida, as amostras correspondentes a cada ponto amostral (uma amostra obtida na linha de plantio e duas amostras obtidas nas entrelinhas) foram homogeneizadas por rolagem em saco plástico, com o objetivo de alcançar maior acurácia na representatividade e obtenção de subamostras.

Figura 2 – Esquema representativo da disposição espacial dos pontos de coleta de solo em cada talhão comercial amostrado nesse estudo. O espaçamento entre cada ponto de coleta foi de aproximadamente 50 metros



Fonte: Autoria própria.

A amostragem do solo foi feita inicialmente no período seco (agosto de 2022) e se repetiu no período chuvoso (janeiro de 2023). A coleta de solo foi feita com materiais previamente esterilizados, sendo o solo coletado com o auxílio de um tubo de PVC com 50 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento, o qual foi penetrado no solo até a profundidade de 20 cm a partir da superfície com o auxílio de uma marreta de borracha (Figura 3).

Figura 3 – Sequência fotográfica das etapas envolvidas na coleta de amostras de solo nos talhões comerciais avaliados no âmbito desse estudo. A - Tubo de PVC utilizado para coleta de solo, marreta de borracha e recipiente para transporte do solo; B – ponto de coleta; C - retirada de porção de solo para análise química; D - retirada de porção de solo para análises moleculares e enzimática



Fonte: Autoria própria.

A coleta de amostra de solo foi destinada à análise molecular e seguiu as recomendações contidas na maioria dos protocolos de amostragem de solos agrícolas para análise microbiana, as quais consideram a zona com maior presença de raízes para amostragem do solo. Amostras de solo para análise enzimática foram coletadas na camada de 0-10 cm a partir da superfície, conforme descrito no protocolo da tecnologia BioAS (EMBRAPA, 2021), utilizando tubo de PVC com 50 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento.

Duas subamostras de solo foram obtidas a partir da amostra composta contendo solo da camada 0-20 cm, tendo sido uma delas armazenada em saco plástico para fins de análise química e outra amostra, com finalidade de análises moleculares, armazenada em tubo tipo Falcon de 50 mL de volume, imediatamente acondicionada em uma caixa térmica com gelo e transportada ao laboratório de Ciências Agrárias da Universidade Brasil, *Campus* de Fernandópolis. No total, foram obtidas 72 subamostras de solo para análises químicas e 72 subamostras de solo para análises moleculares e enzimática (2 classes de solo (Latosolo e Argissolo) x 2 texturas (argiloso e arenoso) x 3 sistemas de manejo (vinhaça, vinhaça combinada com torta de filtro, e adubação mineral) x 3 talhões x 2 períodos sazonais (chuvoso e seco)). Estas últimas foram mantidas à -20 °C até serem processadas. As amostras destinadas à análise enzimática do solo foram mantidas à temperatura ambiente até a realização das análises.

Figura 4 – Amostras de solo para fins de análises moleculares (A) e químicas (B)



Fonte: Autoria própria.

As amostras de solo para fins de análises físicas e químicas foram enviadas para o Laboratório de Análise de Solo do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado no município de Campinas-SP. As amostras destinadas à extração do DNA genômico do solo foram processadas no Laboratório Multiusuário Centralizado para

Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica (LMSeq) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Jaboticabal. Por sua vez, as amostras de solo para análise enzimática foram encaminhadas para a EMBRAPA-Cerrados em Planaltina-DF.

4.2 ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO

Em cada uma das 72 subamostras de solo da camada 0-20 cm, o pH foi medido em uma suspensão solo: água 1: 2,5. Alumínio (Al), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) trocáveis foram extraídos com KCl 1 M. Cálcio e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica e Al por titulação ácido-base. O fósforo (P) e o potássio (K) foram extraídos por resina de troca iônica. A acidez potencial (H + Al) foi estimada por uma equação baseada no pH determinado em solução tampão SMP (pH SMP). Os micronutrientes disponíveis (ferro - Fe, manganês - Mn, zinco - Zn e cobre - Cu) foram extraídos por Mehlich 1 e determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O boro (B) foi extraído com água quente e determinado por espectrofotometria com azometina-H a 420 nm. Alguns dos resultados permitiram o cálculo de outros parâmetros como bases trocáveis (SB), a soma de Ca, Mg e K; capacidade de troca catiônica (CTC), a soma de Ca, Mg, K, Al e H; saturação por bases (V%), relação percentual entre SB e CTC; e saturação de Al (m%), a relação percentual entre Al trocável e CTC (Raij et al, 1997). A matéria orgânica do solo (MO) foi determinada utilizando o método Walkley-Black (Nelson e Sommers, 1996) e calculado de acordo com Jackson (1958). O teor de carbono orgânico do solo foi calculado dividindo o teor de MO pelo fator 1,72 (obtido pela divisão 100/58).

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DO SOLO

O DNA genômico de cada uma das 72 subamostras de solo destinadas à análises moleculares foi extraído utilizando o Kit DNeasy PowerSoil Pro[®] (Qiagen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante. A concentração e qualidade do DNA foram determinadas em espectrofotômetro tipo NanoDrop (NanoDrop[®] ND-1000 UV/vis-spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) seguido por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1x (10,78 g L⁻¹ de Tris; 0,58 g L⁻¹ de EDTA; e 5,50 g L⁻¹ de ácido bórico) submetidos a 90 Volts por 1 h. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até ser utilizado.

4.4 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

O número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* foi determinado a partir das 72 diferentes amostras de DNA genômico do solo utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para tanto, curvas padrões foram construídas utilizando 5 diluições em série (variando de 10^2 a 10^7 cópias) de DNA plasmidial contendo os genes de interesse provenientes de cepas obtidas da coleção alemã *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) – *Sinorhizobium meliloti* (DSM 30135) (*nirK*), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090) (*nirS*) e *Bradyrhizobium japonicum* (DSM 1755) (*nosZ* I). As reações foram feitas no equipamento QuantStudio™ 3 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As reações de qPCR foram preparadas em volume de 10 μ L contendo 5 μ L do Kit SybrGreen Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), 3,35 μ M de cada *primer* (Tabela 1) para os genes *nirK* e *nirS*, e 4,70 μ M para o gene *nosZ*, 0,5 μ L de BSA a 0,6% e 1 μ L da amostra de DNA genômico do solo.

As condições utilizadas para amplificação do gene *nirK* foram: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos (40 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 1 segundo. Para o gene *nirS* as condições de amplificação foram: 94 °C por 2 minutos, 95 °C por 15 segundos, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto (50 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 15 segundos. Por fim, o gene *nosZ* foi amplificado utilizando as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos (45 ciclos), seguido de *melting curve* a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto, e 95 °C por 15 segundos. A fluorescência foi captada ao final da etapa de extensão em cada ciclo de amplificação. Uma análise da curva de dissociação (*melting curve*) do produto da amplificação foi feita para confirmar se a origem dos sinais de fluorescência foi de amplicons específicos ou de primer dimers e/ou outros artefatos. Análises automatizadas da qualidade (p.e. subtração do ruído de fundo da fase patamar e configuração do ciclo limiar – Ct – na fase de amplificação linear) e quantidade da amplificação foram feitas com o QuantStudio® Design and Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Tabela 1 – Informações sobre os *primers* que foram utilizados para quantificação do número de cópias de genes funcionais microbianos relacionados com o processo de desnitrificação

Genes	Funções	Sequência dos <i>primers</i>	Referências
<i>nirK</i>	Redução de nitrito a óxido nítrico ou amônia	<i>nirK</i> 876 (ATYGGCGGVAYGGCGA) <i>nirK</i> 1040 (GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG)	Henry, et al. (2004) Braker, et al. (1998)
<i>nirS</i>	Redução de nitrito a óxido nítrico	<i>nirS</i> cd3f (GTNAAYGTNAARGARACNGG) <i>nirSR</i> 3cd (GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA)	Throback, et al. (2004)
<i>nosZ</i> I	Redução de óxido nítrico a gás nitrogênio	<i>nosZ</i> 2F (CGCRACGGCAASAAGGTSMSST) <i>nosZ</i> 2R (CAKRTGCAKSGCARTGGCAGAA)	Henry, et al. (2006)

Fonte: Autoria própria.

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

$$NC/g \text{ solo} = QC \times 4 \times 100$$

Onde,

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

QC = Quantidade de cópias obtida na análise de qPCR

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

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SOLO

A atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase foi determinada em duplicata nas 72 amostras de solo, incluindo um controle, conforme descrito em Tabatabai (1994). As amostras de solo foram preparadas de acordo com o conceito de amostra de solo FERTBIO, descrito em Mendes et al. (2019). Todas as amostras de solo foram secas ao ar, em temperatura ambiente, por duas semanas, passadas por peneira de 2 mm e armazenadas em temperatura ambiente até a realização das análises.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram aplicados aos conjuntos de dados obtidos com a análise química do solo, atividade enzimática do solo e quantificação dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*, considerando o nível de significância de 0,05. Para tanto, foi utilizado o programa R versão 4.4.0 (R Core Team, 2018), software livre para computação estatística.

Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados para gerar um gráfico de correlação de mapa de calor (*heatmap*) para ilustrar o grau de conexão desses conjuntos de dados: i. a matéria orgânica do solo, ii. a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase, e iii. o número absoluto de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* no solo. Esta análise foi realizada no ambiente R v.4.4.0 com o pacote “corrplot” (Pollard et al., 2005). Análise estatística de correlação do número de cópias dos genes funcionais microbianos e a atividade enzimática do solo também foi feita usando o programa R versão 4.4.0 e os pacotes “vegan” 2.5-7 (OKSANEN et al., 2022), “ggpubr” 0.4.0 (KASSAMBARA, 2020) e “ggplot2” 3.3.5 (WICKHAM e CHANG, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DOS FATORES QUÍMICOS DO SOLO

Os resultados das análises químicas do solo foram apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os valores obtidos para os fatores químicos do solo apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) ao comparar as texturas arenosa e argilosa, bem como os manejos agrícolas (aplicação de vinhaça, adubação mineral e aplicação de vinhaça e torta de filtro) dentro de uma mesma classe de solo.

De acordo com os dados descritos na Tabela 2, o Latossolo arenoso com aplicação de vinhaça teve um aumento significativo de P, Ca e Mg. Por sua vez, os teores de K e Fe foram maiores nessa classe e textura de solo com a aplicação de torta de filtro. A adubação mineral cooperou com o aumento do H + Al e Mn. Quanto ao Argissolo, a aplicação de vinhaça aumentou os valores de P, enquanto nesse solo a adubação mineral aumentou os teores de matéria orgânica (M.O.), H + Al, Cu, Mn e Fe.

De acordo com a Tabela 3, no Latossolo arenoso, o tratamento com vinhaça apresentou elevadas concentrações de Ca e Mg. Por sua vez, a adubação mineral aumentou os teores de Mn nesse solo.

Em se tratando de Latossolo, de acordo com as informações das Tabelas 2 e 3, notou-se que em textura arenosa, o manejo com vinhaça aumentou a concentração de macro e micronutrientes. Este fato pode estar relacionado com a capacidade da vinhaça em alterar a acidez ativa do solo, o que acelera a dissolução desses minerais (LOPES et al., 2013). Além disso sabe-se que a vinhaça é constituída principalmente por matéria orgânica sob forma de ácidos orgânicos e cátions como o K, Mg e Ca (SEIXAS et al., 2016), o que pode justificar o incremento desses nutrientes neste manejo.

No período chuvoso, o manejo teve maior influência nos fatores químicos do Latossolo de textura arenosa, enquanto no período seco essa influência foi maior em Argissolo de textura arenosa.

Com relação ao Argissolo, a Tabela 2 demonstra que na textura arenosa apenas o manejo com vinhaça apresentou diferença estatística na concentração de Fe no período chuvoso. No período seco não houve diferença estatística nesse tipo de solo. Para a textura argilosa, o período chuvoso destacou o manejo com vinhaça e torta de filtro, o qual cooperou com o aumento significativo nos teores de P, Ca, Mg,

Cu e Zn. No período seco, os manejos com vinhaça e vinhaça combinada com torta de filtro não apresentaram diferença estatística entre si quanto aos fatores químicos do solo, mas apresentaram maior efetividade na concentração de P, Ca, Mg e Zn quando comparados ao manejo com aplicação de adubo mineral.

A fertirrigação com vinhaça em Argissolo propicia maior mineralização devido a grande concentração de nutrientes e matéria orgânica desse resíduo (DOELSCH et al., 2009). Por sua vez, a torta de filtro possui capacidade de aumentar os teores de macro e micronutrientes do solo (ALMEIDA JUNIOR et al., 2011). Quando associados (vinhaça e torta de filtro) a tendência do solo é apresentar maior concentração e menor deterioração de seus atributos químicos (VASCONCELOS et al., 2010).

As análises estatísticas revelaram maior diferença para os fatores químicos em Latossolo dentro da mesma textura e manejo em comparação com Argissolo nas mesmas condições no período seco. Os períodos seco e chuvoso apresentaram diferença quanto aos fatores químicos do solo, tendo o período seco revelado valores de média inferiores quando comparado com o período úmido.

Tomados em conjunto, esses resultados permitem aceitar a hipótese que os solos canavieiros classificados como Latossolo e Argissolo, com textura argilosa e arenosa diferem em relação ao manejo adotado sendo estes, aplicação de vinhaça, adubação mineral e vinhaça + torta de filtro, com variação em função de fatores químicos do solo.

Tabela 2 – Fatores químicos do solo coletado no período chuvoso na camada de 0-20 cm nas áreas de estudo sob Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso

Variável	Latossolo						Argissolo					
	Arenoso			Argiloso			Arenoso			Argiloso		
	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM
COS	7,6 ^a aaa±1,0 ^s	8,5aaa±1,2	6,8aba±2,2	8,7aab±1,0	8,9aab±1,3	14,7aaa±1,5	5,6aaa±1,5	4,5bba±1,2	5,0aaa±0,3	5,2baa±0,6	8,5aaa±3,8	6,0baa±0,9
MO	13,0aaa±1,7	14,7aaa±2,1	11,7aba±3,8	15,0aab±1,7	15,4aab±2,3	25,4aaa±2,1	9,7aaa±2,5	7,7bba±2,1	8,7aaa±0,6	9,0baa±1,0	14,7aaa±6,5	10,4baa±1,5
pH	6,5aaa±0,2	6,3aaa±0,2	5,4bab±0,2	6,5aaa±0,1	5,8bbb±0,3	5,2bab±0,2	5,8baa±0,8	6,3aba±0,2	6,2aaa±0,1	6,3aab±0,2	7,2aaa±0,2	6,0aab±0,3
P	167,3aaa±48,2	110,7aaa±15,8	24,3aab±11,7	60,0aba±15,0	16,0bbab±4,2	25,0aab±3,3	46,0baa±3,5	21,7bba±7,5	37,0aaa±6,0	37,3aab±29,0	143,3aaa±65,0	27,0aab±19,0
K	2,6 abb±0,2	5,5aaa±1,5	1,3abb±0,8	6,9aaa±1,1	6,8aaa±0,5	4,6aab±1,6	3,1aaa±0,2	2,4baa±0,7	2,1aaa±0,1	3,2baa±0,1	3,3baa±0,4	2,1baa±0,8
Ca	195,3aaa±70,0	42,7aab±4,2	17,7bbc±3,2	45,3aba±2,1	36,0baa±7,0	52,7aaa±7,5	28,0baab±11,5	18,3bbb±5,5	39,3aaa±5,1	25,7bab±5,5	159,3aaa±91,5	30,7bab±8,1
Mg	55,3aaa±15,6	20,7aab±2,5	7,3bbc±1,5	22,3aba±1,2	17,3baa±2,5	18,7aaa±3,3	10,7baab±3,2	10,0bbb±3,0	17,3aaa±4,2	12,7bab±2,5	48,7aaa±34,1	12,0bab±2,6
Hal	8,3bbb±0,6	11,7aba±1,2	14,7aba±2,5	11,7aac±0,6	19,3aab±1,5	31,0aaa±5,4	12,3aaa±4,0	9,3aaa±0,6	9,3baa±0,6	10,0aaa±1,0	7,0bbb±1,7	10,7baa±1,2
SB	253,3aaa±62,2	68,8aab±6,2	26,3bbc±3,9	74,5aba±2,1	60,1baa±9,9	75,9aaa±9,5	41,8baab±14,6	30,7bbb±9,2	58,8aaa±9,0	41,6bab±8,9	211,2aaa±121,6	44,7bab±10,9
CTC	261,6aaa±62,8	80,5aab±5,1	40,9bbc±3,4	86,2aba±2,0	79,4baa±8,4	106,9aaa±6,7	54,0baab±11,0	40,1bbb±9,7	68,1aaa±8,7	51,6bab±7,9	218,3aaa±120,1	55,4bab±9,9
V	96,7aaa±0,6	85,7aaa±2,3	64,0bab±6,1	86,3bba±0,6	75,7bbab±4,5	70,7baab±5,8	75,7baa±12,9	76,0bba±4,6	86,0aaa±2,0	80,0aab±5,6	96,0aaa±3,0	80,3aab±5,7
B	0,27aaa±0,0	0,22aaa±0,1	0,26aaa±0,0	0,22bba±0,6	0,25baa±0,1	0,30bba±0,1	0,23aaa±0,1	0,36aaa±0,0	0,31aaa±0,0	0,83aaa±0,1	0,47aaa±0,1	0,68aaa±0,1
Cu	1,3aba±0,3	1,4aba±0,1	0,4bbb±0,1	4,27aac±0,3	11,1aab±0,6	17,5aaa±1,0	0,8baab±0,1	0,53bbb±0,2	0,87aaa±0,1	0,73bab±0,1	1,17baa±0,3	0,77baa±0,2
Fe	22,7aab±3,2	44,7baa±14,0	24,3bab±8,0	15,0aaa±2,6	25,0aaab±3,0	37,0baab±10,4	30,0abb±13,1	12,3aaa±0,6	12,3aaa±1,2	16,7aaa±0,6	21,7aba±10,7	15,7aaa±2,5
Mn	6,77bbb±2,5	3,5bbc±0,6	20,6aba±3,3	22,5 aab±2,1	69,3 aaa±3,0	81,4aaa±16,9	17,3aaa±5,3	23,9aaa±8,1	19,1aaa±3,4	15,4baab±1,2	10,0 bbb±0,8	20,8baa±0,5
Zn	1,4aaa±0,6	1,9aaa±0,3	1,7aaa±0,9	2,1 aaa±0,5	2,0 aaa±0,6	2,2 aaa±0,2	1,0aaa±0,2	0,8bba±0,2	1,0aaa±0,1	1,1bab±0,3	2,3 aaa±1,2	1,0bab±0,3
pHSMP	7,5aaa±0,1	7,2aab±0,1	7,0bab±0,2	7,2 aaa±0,1	6,7 bbb±0,1	6,3 bbc±0,2	7,2baa±0,3	7,5aba±0,1	7,4aaa±0,0	7,4aab±0,1	7,8 aaa±0,3	7,3aab±0,1

Os valores estão cauculados em g/dm³ para Mo, mmolc/dm³ para macrominerais e cauculos a dicionais (S.B, C.T.C, H+Al), mg/dm³ para microminerais e para V %.

Média calculada a partir de três repetições.

Desvio padrão calculado a partir de três repetições.

Valores com letras iguais não são significativamente diferentes ($P<0.05$), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas. Letras nos estilos romano, itálico e negrito contrastam, respectivamente: classes de solo, texturas e manejos do solo.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Fatores químicos do solo coletado no período seco na camada de 0-20 cm nas áreas de estudo sob Latossolo e Argissolo arenoso e argiloso

Variável	Latossolo						Argissolo					
	Arenoso			Argiloso			Arenoso			Argiloso		
	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM
COS	4,8 ¹ aba±0,3 [§]	6,0aaa±0,9	4,5aba±1,5	8,9aaa±1,2	10,7aaa±0,9	12,6aaa±0,7	6,6aaa±0,7	6,8aaa±1,5	7,0aaa±2,0	4,1baa±0,6	4,3aaa±3,4	4,3baa±0,9
MO	8,3aba±0,6	10,3aaa±1,5	7,7aba±2,5	15,3aaa±2,1	14,7aaa±1,5	21,7aaa±1,2	11,3aaa±1,2	10,7aaa±2,5	12,0aaa±3,5	7,0baa±1,0	12,0aaa±5,9	7,3baa±1,5
pH	6,1aaa±0,5	5,8baa±0,2	5,5baa±0,1	6,1aaa±0,1	5,3aaa±0,3	5,9aaa±0,1	6,2aaa±0,4	6,6aaa±0,7	6,4aaa±0,1	5,9aaa±0,2	5,8aba±1,1	4,9abb±0,1
P	63,7aaa±12,7	62,3aaa±6,8	32,7baa±24,7	39,0aab±61	88,0aaa±2,9	16,3aab±3,1	48,7aaa±11,5	53,0aaa±29,0	68,7aaa±2,2	67,7aaa±31,2	58,3aaa±27,0	11,7abb±4,5
K	4,0aaa±3,9	4,9aaa±0,8	3,6aaa±1,2	9,0aba±2,6	5,3aaa±9,7	4,2aaa±0,4	4,5aaa±0,7	6,5aaa±1,6	3,2aaa±0,5	5,1aaa±0,7	6,2aaa±0,4	4,0aaa±0,9
Ca	72,3aaa±34,3	30,0bbb±10,6	30,3bbb±5,9	46,3aaa±47	47,7aaa±33,7	56,6aaa±3,1	48,7aaa±11,9	60,3aaa±6,8	55,3aaa±7,5	42,7aaa±10,1	39,0aaa±3,6	21,7bbb±2,1
Mg	28,3aaa±9,0	12,7aab±2,5	9,7bab±2,5	21,7aaa±1,5	19,0aaa±5,5	16,7aaa±1,5	19,7aaa±6,7	21,3aaa±4,6	23,0aaa±4,0	16,7aaa±6,7	16,0aaa±3,5	5,0bbb±1,0
Hal	10,0aaa±1,7	13,3aaa±3,2	14,0aba±2,0	13,3aab±0,6	15,0aab±3,1	29,7aaa±1,2	10,0aaa±1,0	9,3aba±4,2	10,3aba±1,2	10,7aaa±1,5	16,7aaa±1,0	15,0baa±12,1
SB	104,7aaa±42,2	47,5abb±13,1	43,6bbb±6,4	77,1aaa±4,9	71,9aaa±41,8	77,6aaa±3,7	72,8aaa±18,5	88,2aaa±11,1	81,6aaa±12,0	64,4aaa±15,9	61,2aaa±5,2	30,7bbb±1,7
CTC	114,7aaa±40,8	60,9aab±10,8	114,7bbb±8,4	90,4aaa±5,4	86,9aaa±39,1	107,3aaa±4,7	82,8aaa±18,9	97,5aaa±12,0	91,9aaa±13,0	75,1aaa±14,5	77,9aaa±11,1	44,7bbb±2,7
V	90,0aaa±4,6	77,3bab±8,6	75,7bab±0,6	85,0aaa±0,0	82,7aab±5,5	72,3aab±0,6	87,3aaa±2,3	88,3aaa±4,7	89,0aaa±1,0	85,3aaa±0,5	77,3abb±15,0	67,3abb±0,6
B	0,25aba±0,1	0,40aaa±0,3	0,30aaa±0,2	0,56aaa±0,1	0,33aaa±0,0	0,57aaa±0,4	0,21aaa±0,1	0,22aaa±0,1	0,24aaa±0,1	0,28aaa±0,1	0,30aaa±0,2	0,30aaa±0,1
Cu	1,2aba±0,2	0,57aaa±0,3	1,1aba±0,3	5,5 aab±0,9	2,9aab±1,4	13,9aaa±0,3	0,8aaa±0,1	3,6aaa±0,1	1,1aaa±0,2	0,7 baa±0,1	3,6aaa±0,4	0,53baa±0,2
Fe	26,3aaa±6,4	33,7aaa±17,6	24,3aaa±9,2	21,0aaa±1,7	35,7aaa±11,4	26,0aaa±2,0	28,7aaa±12,4	15,7bba±14,6	19,3aaa±2,9	21,0aaa±1,7	52,7aaa±52,9	36,0aaa±14,9
Mn	9,8bbb±3,0	5,2bbc±1,3	19,8aba±3,4	21,8aab±2,6	22,7aab±4,6	47,8aaa±2,3	14,3aaa±1,0	19,8aaa±1,0	13,6aaa±1,0	11,8bab±0,8	24,8aaa±8,3	17,3baab±3,2
Zn	1,8aaa±0,6	1,7aaa±0,9	1,4aaa±0,1	1,7aaa±0,3	2,6aaa±0,6	1,1aaa±0,1	1,0aaa±0,3	1,3aaa±1,3	1,5aaa±0,2	1,7aaa±0,3	4,4aaa±5,1	0,9abb±0,5
pHSMP	7,4aaa±0,2	7,1baa±0,2	7,1aaa±0,1	7,1aaa±0,1	7,0aaa±0,2	6,3bbb±0,0	7,4aaa±0,1	7,5aaa±0,3	7,4aaa±0,1	7,3aaa±0,1	7,1aba±0,7	7,0aba±0,1

Os valores estão caucalados em g/dm³ para Mo, mmolc/dm³ para macrominerais e cauculos a dicionais (S.B, C.T.C, H+Al), mg/dm³ para microminerais e para V %.

Média calculada a partir de três repetições.

Desvio padrão calculado a partir de três repetições.

Valores com letras iguais não são significativamente diferentes ($P<0.05$), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas. Letras nos estilos romano, itálico e negrito contrastam, respectivamente: classes de solo, texturas e manejos do solo.

Fonte: Autoria própria.

5.2. NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES *nirK*, *nirS* E *nosZ*

No geral, o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* em solos de cana-de-açúcar, conforme determinado por qPCR (expresso como 10^5 cópias de genes por grama de solo), foi maior durante a estação chuvosa em comparação com a estação seca (Tabela 3). O gene *nirK* foi o mais abundante nas amostras avaliadas, seguido por *nosZ* e *nirS*. O fragmento do gene *nirS* teve a menor abundância em todos os locais de amostragem, independentemente da estação ou estratégia de manejo agrícola do solo.

Nenhum dos genes avaliados revelou resposta consistente aos diferentes manejos de solo da cana-de-açúcar, mostrando um padrão de resposta para cada classe e textura de solo (Latossolo arenoso: adubo mineral < vinhaça + torta de filtro < vinhaça; Latossolo argiloso: vinhaça < adubo mineral < vinhaça + filtro torta; Argissolo arenoso: vinhaça + torta de filtro < vinhaça < adubo mineral; Argissolo argiloso: adubo mineral < vinhaça < vinhaça + torta de filtro).

Tabela 4 – Número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* determinado por PCR quantitativo em tempo real a partir de amostras de solo coletadas em período chuvoso e seco

Genes funcio nais	Latossolo						Argissolo					
	Arenoso			Argiloso			Arenoso			Argiloso		
	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM
----- Período chuvoso -----												
<i>nirK</i>	38,2 [¶] abb ±3,0 [§]	28,1 aaa ±2,5	27,6 aaa ±2,4	24,5 aaa ±2,2	39,4 bbb ±1,2	37,3 bbb ±3,1	35,7 aaa ±5,5	33,9 bbba ±2,3	43,2 bbba ±3,4	21,3 abb ±3,4	24,6 abb ±1,7	18,1 aaa ±1,4
<i>nirS</i>	0,4 abb ±0,03	0,3 aaa ±0,005	0,3 aaa ±0,02	0,3 aaa ±0,01	0,4 bbb ±0,02	0,4 bbb ±0,01	0,4 aaa ±0,02	0,4 bba ±0,01	0,5 bbb ±0,03	0,3 aaa ±0,01	0,3 aaa ±0,03	0,3 aaa ±0,01
<i>nosZ</i>	4,3 abb ±1,1	2,8 aaa ±0,1	2,6 aaa ±0,2	2,5 aaa ±0,3	3,2 abb ±0,2	3,2 bbb ±0,1	3,7 aaa ±0,3	3,0 aaa ±0,8	4,7 bba ±0,9	3,2 aaa ±1,3	3,5 aaa ±0,2	2,7 aaa ±0,2
----- Período seco -----												
<i>nirK</i>	28,1 abb ±2,4	18,4 aaa ±1,9	16,3 aaa ±1,5	13,3 aaa ±1,4	18,7 bbb ±0,8	17,2 bbb ±1,9	22,8 aaa ±2,7	16,4 bba ±1,1	24,9 bbba ±2,0	11,5 abb ±2,5	13,3 abb ±0,3	10,8 aaa ±0,1
<i>nirS</i>	0,04 aba ±0,02	0,04 bba ±0,03	0,4 aaa ±0,01	0,03 aaa ±0,01	0,03 bba ±0,02	0,3 bba ±0,01	0,02 aaa ±0,01	0,03 bba ±0,01	0,3 bba ±0,2	0,01 aaa ±0,01	0,02 aaa ±0,02	0,02 aaa ±0,01
<i>nosZ</i>	3,5 abb ±0,9	1,7 aba ±0,4	1,8 aaa ±0,3	1,3 aaa ±0,1	2,0 abb ±0,3	2,3 bbb ±0,2	2,8 aba ±0,1	2,4 aaa ±0,3	3,6 bba ±0,2	2,3 aaa ±0,1	2,6 aaa ±0,2	1,7 aaa ±0,3

Os valores estão expressos em 10⁵ cópias do gene por grama de solo.

[¶]Média calculada a partir de três repetições.

[§]Desvio padrão calculado a partir de três repetições.

Valores com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0.05$), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas. Letras nos estilos romano, itálico e negrito contrastam, respectivamente: classes de solo, texturas e manejos do solo.

Fonte: Autoria própria.

5.3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS β -GLICOSIDASE E ARILSULFATASE

A atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase foi compatível com o manejo agrícola do solo de cana-de-açúcar, aumentando consistentemente na seguinte ordem: vinhaça < adubo mineral < vinhaça + torta de filtro, exceto Argissolo arenoso. Esse aumento foi mais acentuado no Latossolo do que no Argissolo, onde a média de vinhaça + torta de filtro e adubo mineral apresentou 1,8 (solo arenoso) e 3,9 (solo argiloso) vezes mais atividade do que no solo manejado com vinhaça. Este resultado foi observado independentemente do período sazonal avaliado (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase nos solos canavieiros com fertilizantes orgânicos e minerais nos períodos chuvoso e seco

Atividade enzimática	Latossolo						Argissolo					
	Arenoso			Argiloso			Arenoso			Argiloso		
	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM	V	V+T	AM
----- Período chuvoso -----												
β -glicosidase	28,3 [¶] aaa±2,3 [§]	50,7bab±7,8	46,3bab±3,0	37,3aba±7,5	87,7bbb±5,1	62,7bbb±11,1	25,0aaa±11,2	25,0aaa±2,1	18,0aaa±4,6	32,0aaa±5,3	32,3aba±1,5	41,3abb±3,5
Arilsulfatase	21,7aaa±8,0	48,7bab±6,6	37,3baa±12,7	24,3aaa±5,0	169,7bbb±19,5	166,0bbb±33,8	18,0aaa±7,0	24,7aaa±3,5	14,0aaa±4,6	17,0aaa±2,6	46,3abb±4,2	36,0abb±15,0
----- Período seco -----												
β -glicosidase	23,7aaa±1,9	45,5bab±5,9	41,1bab±2,3	32,6aba±4,4	81,9bbb±3,1	57,8bbb±8,5	22,3aaa±9,7	19,4aaa±1,4	13,0aaa±2,2	28,4aaa±3,3	27,7aba±1,1	38,2baa±2,9
Arilsulfatase	18,6aaa±6,2	41,2bab±4,6	33,1baa±9,8	19,9aaa±3,7	147,5bbb±11,9	138,6bbb±27,4	13,4aaa±5,2	20,3aaa±2,5	11,4aaa±2,9	12,4aaa±1,9	41,4abb±3,8	33,5bbb±9,3

Os valores estão expressos em miligrama de p-nitrofenol por quilograma de solo por hora.

[¶]Média calculada a partir de três repetições

[§]Desvio padrão calculado a partir de três repetições

Valores com letras iguais não são significativamente diferentes ($P < 0.05$), baseando-se no teste de *Tukey* entre amostras contrastadas. Letras nos estilos romano, itálico e negrito contrastam, respectivamente: classes de solo, texturas e manejos do solo.

Fonte: Autoria própria.

5.4. CORRELAÇÃO ENTRE GENES FUNCIONAIS, ENZIMAS DO SOLO, MATÉRIA ORGÂNICA E CARBONO ORGÂNICO DO SOLO

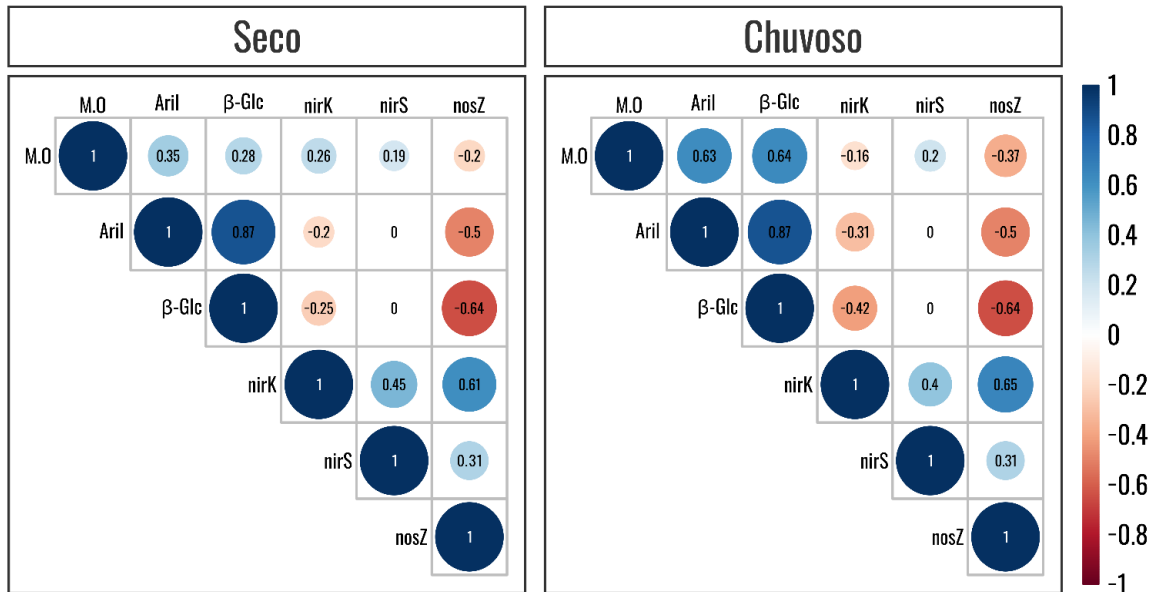
As análises de correlação ($P < 0,05$) visualizadas com *heatmap* (Figura 5) revelaram correlações negativas entre o número de cópias dos genes *nirK* e *nosZ* e a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase no solo em ambos os períodos sazonais analisados. O número de cópias destes dois genes microbianos também foi negativamente correlacionado com o teor de matéria orgânica do solo no período chuvoso.

A atividade das referidas enzimas do solo foi positivamente correlacionada com o teor de matéria orgânica do solo, tanto no período seco quanto no período chuvoso, sendo esta correlação mais acentuada neste último. A atividade enzimática é fortemente influenciada pela umidade do solo (SARDANS e PENUELAS, 2005). Sardans e Penuelas (2005) observaram que a redução da umidade relativa do solo resultou na redução de atividade da urease, β -glicosidase e fosfatase ácida. Zhang e Wang (2006) confirmaram a relação entre enzimas do solo e a umidade, através de avaliações em sistemas irrigados.

É fundamental compreender a sensibilidade da comunidade microbiana que regula o ciclo do nitrogênio nos agroecossistemas frente às mudanças nas condições ambientais e ao manejo agrícola do solo. A produção de N_2O mediada por microrganismos começa com a redução de nitrato (NO_3^-) para nitrito (NO_2^-), seguido pela redução de NO_2^- em óxido nítrico (NO), que é catalisado por enzimas codificadas pelos genes *nirK* e *nirS* (PAJARES e BOHANNAN, 2016). A conversão de um terço do NO em N_2O é seguida pela sua redução para N_2 por N_2O redutases codificadas pelo gene *nosZ*, mitigando assim, parcialmente, a liberação de N_2O para a atmosfera (JONES et al., 2008; HALLIN et al., 2018).

A umidade do solo e a presença de compostos orgânicos afetam a taxa de desnitrificação principalmente aumentando a disponibilidade de carbono orgânico, que é um dos fatores mais importante que influencia a desnitrificação (HANDERSON et al., 2010).

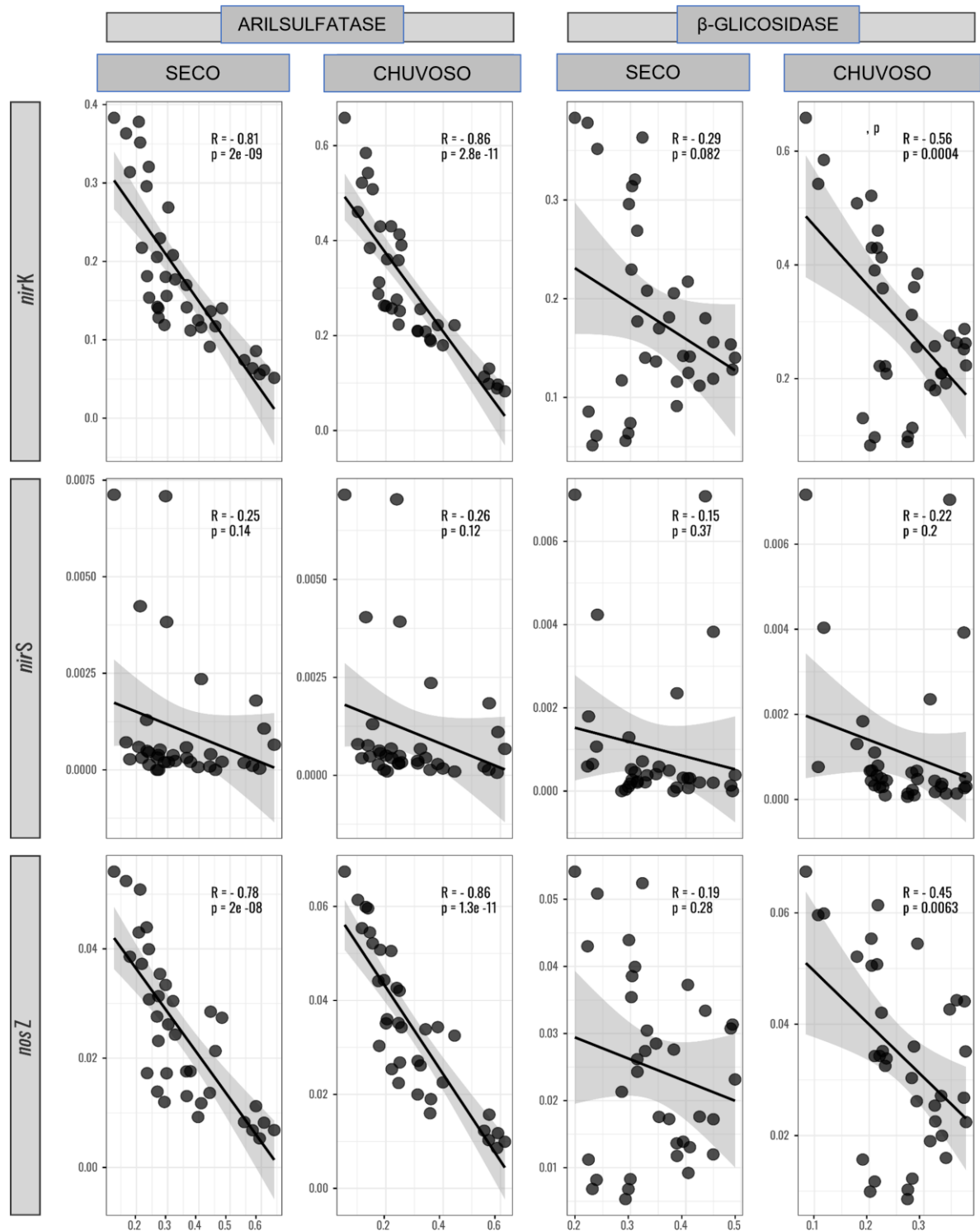
Figura 5 – *Heatmap* com base na matriz de correlação com o teor de matéria orgânica do solo, atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase e número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ*. de acordo com valores significativos ($P < 0,05$) do coeficiente de correlação de Spearman realizado em ambiente R com pacote “Hmink and CorrPlot”. Cores frias representam correlação positivas e cores quentes representam correlações negativas.



Fonte: Autoria própria.

A correlação entre o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* e a atividade das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase nos períodos seco e chuvoso foi negativa (Figura 6), mostrando que a atividade enzimática é capaz de inferir sobre a desnitrificação no ambiente do solo, podendo, indiretamente, refletir o potencial de emissão de óxido nitroso a partir do solo.

Figura 6 – Correlação entre o número de cópias dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* e a atividade das enzimas arilsulfatase e β -Glicosidase nos períodos seco e chuvoso



Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÃO

Embora a quantificação dos genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* não tenha revelado resposta consistente aos diferentes manejos de solo da cana-de-açúcar, mostrando um padrão de resposta para cada classe e textura de solo, o número de cópias destes genes revelou correlação negativa com a atividade das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase nos períodos seco e chuvoso, e correlação negativa com o teor de matéria orgânica do solo no período chuvoso (genes *nirK* e *nosZ*). Dessa forma, as indicações enzimáticas de solo canavieiro saudável são reforçadas pela menor abundância de genes associados com a desnitrificação, permitindo, indiretamente, inferir sobre o potencial de produção de óxido nitroso no solo.

REFERÊNCIAS

- AHIRWAL, J.; MAITI, S. K. Development of Technosol properties and recovery of carbon stock after 16 years of revegetation on coal mine degraded lands, India. **Catena**, v. 166, p. 114-123, 2018.
- ALLEONI, L. R. F.; BORBA, R. P.; CAMARGO, O. A. Metais pesados: da cosmogênese aos solos brasileiros. In: Tópicos em Ciência do Solo, IV. **Sociedade Brasileira De Ciência do Solo**, v. 4, p. 1-42, 2005.
- ASENSIO, V.; VEGA, F. A.; ANDRADE-COUCÉ, M. L.; COVELO, E. F. Technosols made of wastes to improve physico-chemical characteristics of a copper mine soil. **Pedosphere**, v. 23(1), p. 1-9, 2013.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.007: Amostragem de Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.
- BAKER, A. J. M.; McGRATH, S. P.; SIDOLI, C. M. D.; REEVES, R. D. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 11, p. 41-49, 1994.
- BERNARDES, A.; THOMÉ, A.; PRIETTO, P.D.M.; DE ABREU, A.G., Quantificação e classificação dos resíduos da construção e demolição coletados no município de Passo Fundo, RS. **Ambiente Construído**, v. 8, p. 65–76, 2008.
- BORGES, V. P.; COSTA, M. A. P. C.; RIBAS, R. F. Emergência e crescimento inicial de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo em ambientes contrastantes de luz. **Revista Árvore** v. 38(3), 2014.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução CONAMA Nº. 307, de 05 de julho de 2002**. Ministério do Meio Ambiente, 2002.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução CONAMA Nº. 420, de 28 de dezembro de 2009**. Ministério do Meio Ambiente, 2009.
- BRASILEIRO, L.L.; MATOS, J.M.E. Revisão bibliográfica: reutilização de resíduos da construção e demolição na indústria da construção civil. **Cerâmica**, v. 61, p. 178– 189, 2015.
- BURNS, K.N. et al. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 91, p. 232-247, 2015.
- CASTRO, O.M. de. **Preparo de solo para a cultura do milho**. Campinas: Fundação Cargill. 1989. 41p.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. P4.231 - Norma Padrão para Emissões de Particulados. São Paulo: CETESB, 2003. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/camaras-ambientais/wpcontent/uploads/sites/21/2013/12/P4_231.
- CARVALHO, P. E. R. **Comportamento de essências florestais nativas e exóticas em dois locais do Estado do Paraná**. In: Congresso Florestal Brasileiro, 1982, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p. 262-266, 1994.

- DE SUTTER, T.; GOOSEN-ALIX, P.; PRUNTY, L. Smooth brome (*Bromus inermis* Leyss) and soil chemical response to concrete grinding residue application. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 222, p. 195–204, 2011.
- ESWARAN, H.; VAN DEN BERG, E.; REICH, P. Organic carbon in soils of the world. **Soil Science Society of America Journal**, v. 57, p. 192-194, 1993.
- SOUZA, A. P. de; CRUZ, J. C.; SILVA, S. C. da. Tecnologia e uso de bioás. Brasília: Embrapa, 2023. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, 369).
- GHOSE, M. Management of topsoil for geo-environmental reclamation of coal mining areas. **Environmental Geology**, v. 40, p. 1405-1410, 2001.
- GHOSE, M. K.; KUNDU, N. K. Deterioration of soil quality due to stockpiling in coal mining areas. **International Journal of Environmental Studies**, p. 327-335, 2007.
- GIAM, X.; OLDEN, J. D.; SIMBERLOFF, D. Impact of coal mining on stream biodiversity in the US and its regulatory implications. **Nature Sustainability**, v.1, p. 176-183, 2018.
- GUIMARÃES, J. E. P. **ACal: Fundamentos e Aplicações na Engenharia Civil, Associação Brasileira dos Produtores de Cal**, 1ª Edição, São Paulo, 1998.
- HALLIN, S.; PHILIPPOT, L.; LOFFLER, F. E.; SANFORD, R. A.; JONES, C. M. Genomics and ecology of novel N₂O-reducing microorganisms. **Trends in Microbiology**, v. 26, p. 43–55, 2018.
- HANDERSON, S. L.; DANDIE, C. E.; PATTEN, C. L.; ZEBARTH, B. J.; BURTON, D. L.; TREVORS, J. T.; et al. (2010). Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2155–2164, 2010.
- HEDDE, M.; NAHMANI, J.; SÉRÉ, G.; AUCLERC, A.; CORTET, J. Early colonization of constructed Technosols by macro-invertebrates. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, p. 3193-3203, 2019.
- HUGEN, C.; MIQUELLUTI, D. J.; CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; FERREIRA, E. R. N. C.; POZZAN, M. Teores de Cu e Zn em perfis de solos de diferentes litologias em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17(6), p. 622–628, 2013.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Brasileiro de 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.
- IUSS WORKING GROUP WRB, 2014. **World Reference Base for Soil Resources**. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Rome, Italy. v. 106, p. 203, 2014.
- JONES, C. M.; STRES, B.; ROSENQUIST, M.; HALLIN, S. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1955–1966, 2008.
- KASCHUK, G., ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 42, p. 1-13p, 2010.

KASSAMBARA, A. **ggubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R Package Version 0.4.0.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2020.

KLUGE, M., GUPTA, N., WATTS, B., CHADIK, P.A., FERRARO, C., TOWNSEND, T.G. Characterisation and management of concrete grinding residuals. **Waste Management & Research**, v. 36, p. 149–158, 2018.

KUNDU, N. K.; GHOSE, M. K. **Shelf life of stock-piled topsoil of an opencast coal mine.** Cambridge University Press, 1997.

LAMONICA, H. M. Geração de Eletricidade com Biomassa de Cana-de-Açúcar. In: Workshop sobre Geração de Energia com Biomassa, 24 nov. 2005, São Paulo. Anais. São Paulo: COGEN, p. 1-22, 2005.

LASSO, P. R. O. **Avaliação da utilização de resíduos de construção civil e demolição reciclados. (RCD-R) como corretivos de acidez e condicionadores de solo.** Tese. Universidade de São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Ciências, p. 122, 122 fl, 2011.

LIMA, E. S. A.; SOBRINO, N. M. B. A.; MAGALHÃES, M. O. L.; GUEDES, J. N.; ZONTA, E. Absorção de bário por plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) e mobilidade em solo tratado com baritina sob diferentes condições de potencial redox. **Química Nova**, v. 35(9), p. 1746–1751, 2012.

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. I.; MELO, W. J. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p.132-138, 2010.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H.; LEAL, M. R. L. V. Assessment of greenhouse gas emissions in the production and use of fuel ethanol in Brazil. São Paulo: Government of the State of São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2004.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 121-132, 2000.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J. A.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Bioenergia da Cana. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds.). Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool. 2. ed. Viçosa: UFV, v. 1, p. 487-517, 2012.

MATOS, W., NOBREGA, J. A. O. Especificação de cromo em cimentos e derivados de cimento brasileiros. **Química Nova**, v. 32(8), p. 2094–2097, 2009.

MEJÍA-RESTREPO, E. M.; OSORNO-BEDOYA, L. O.; OSORIO-VEJA, N. O. Resíduos de La construcción: uma opción para la recuperación de suelos. **Revista EIA**, v. 12(2), p. 55–60, 2015.

MENDES, I. C.; SOUZA, L. M.; SOUSA, D. M. G. S.; LOPES, A. A. C.; REIS JUNIOR, F. B.; LACERDA, M. P. C.; MALAQUIAS, J. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. **Applied Soil Ecology**, v. 139, p. 85-93, 2019.

MENDES, I.C.; CHAER, G.M.; REIS JUNIOR, F.B.; SOUSA, D.M.G.; DANTAS, O.D.; OLIVEIRA, M.I.L.; MALAQUIAS, J.V. **Tecnologia BioAS: uma maneira simples e eficiente de avaliar a saúde do solo.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2021., 2021 (Série Documentos, n 369).

MUZILLI, O. Influência do sistema de plantio direto, comparado ao convencional sobre a fertilidade da camada arável do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, v.7, p.95-102, 1983.

- MURGUÍA, D. I.; BRINGEZU, S.; SCHALDACH, R. Global direct pressures on biodiversity by large-scale metal mining: Spatial distribution and implications for conservation. **Journal of Environment Management**, v. 15(180), p. 409-420, 2016.
- NAVARRETE, A.A.; MELLIS, E.V.; ESCALAS, A.; LEMOS, L.N.; LAVRES JUNIOR, J.; QUAGGIO, J.A.; ZHOU, J.; TSAI, S.M. Zinc concentration affects the functional groups of microbial communities in sugarcane-cultivated soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 236, p. 187-197, 2017.
- NAVARRETE, A.A.; BONASSI, R.C.; AMERICO-PINHEIRO, J.H.P.; VAZQUEZ, G.H.; MENDES, L.W.; LOUREIRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; TSAI, S.M. **Methods to identify soil microbial bioindicators of sustainable management of bioenergy crops**. In: Lilia C Carvalhais; Paul G Dennis. (Org.). *The Plant Microbiome (Methods in Molecular Biology)*. 1ed. Suíça: Springer Nature, 2021, v.1, p. 251-263.
- NAVARRETE, A.A.; KURAMAE, E.E.; DE HOLLANDER, M.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, p. 607-621, 2013.
- NAVARRETE, A. A.; DINIZ, T. R.; BRAGA, L. P. P.; SILVA, G. G. Z.; FRANCHINI, J. C.; ROSSETTO, R.; EDWARDS, R.A.; TSAI, S.M. Multi-analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6., 2015.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; et al. **Vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.5-7. 2022.
- PAJARES, S., BOHANNAN, B. J. M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. **Frontiers in Microbiology**, 7:1045, 2016.
- PERLATTI, F.; MARTINS, E. P.; OLIVEIRA, D. P.; RUIZ, F.; ASENSIO, V.; REZENDE, C. F.; OTERO, X. L.; FERREIRA, T. O. Copper release from waste rocks in an abandoned mine (NE, Brazil) and its impacts on ecosystem environmental quality. **Chemosphere**, v. 262, e127843, 2021.
- POLLARD, K.S.; SANDRINE, D.; VAN DER LAAN, M.J. Multiple testing procedures: the multtest package and applications to genomics. In: **Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor**. New York: Springer, 2005. pp. 52.
- R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2023.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). Cana-de-açúcar. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. (Boletim Técnico. 100). 2.ed. Campinas. Instituto Agronômico - Fundação IAC. p.237-239, 1997.
- RAMANI, R. V. Surface mining technology: progress and prospects. **Procedia Engineering**, v. 46, p. 9-21, 2012.
- REICHL, C.; SCHATZ, M. International Organizing Committee for the World Mining Congresses, 2022. Disponível em: <https://www.world-mining-data.info/wmd/downloads/PDF/WMD2022.pdf>

- RACHID, C. T.; PICCOLO, M. C.; LEITE, D. C. A.; et al. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado soil under differing sugarcane harvest management systems. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 170, 2012.
- REIS, G. S.; CAZACLIU, B.; CORREA, C. R.; OVSYANNIKOVA, E.; KRUSE, A.; SAMPAIO, C. H.; LIMA, E. C.; DOTTO, G. L. Adsorption and recovery of phosphate from aqueous solution by the construction and demolition wastes sludge and its potential use as phosphate-based fertiliser. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8(1), e103605, 2020.
- RODRÍGUEZ-VILA, A.; CASTRO, R.F.; GUEDES, R.; COVELO, E. F. Nutrient phytoavailability in a mine soil amended with technosol and biochar and vegetated with *Brassica juncea*. *Journal of Soils and Sediments*, v. 17(6), p. 1-9, 2017.
- RUIZ, F.; CHERUBIN, M. R.; FERREIRA, T. O. Soil quality assessment of constructed Technosols: Towards the validation of a promising strategy for land reclamation, waste management and the recovery of soil functions. *Journal of Environmental Management*, v. 15(276), e111344, 2020.
- SARDANS, J.; PEÑUELAS, J. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. Forest. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 455-461, 2005
- SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G.; FARIAS, J. **Comportamento silvicultural de algumas espécies nativas plantadas sob capoeira na Depressão Central do Rio Grande do Sul**. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, 1992, Nova Prata. Anais ... Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata, p. 1037-1047, 1992.
- SCHNEIDER, P. S. P.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G. Crescimento do ipê-roxo *Tabebuia impetiginosa* Martius ex A. P. De Candolle, na depressão central do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Florestal*, v. 10, n. 2, p. 91-100. 2000.
- SOARES, B. D. **Estudo da produção de óxido de cálcio por calcinação do calcário: caracterização dos sólidos, decomposição térmica e otimização paramétrica** / Bruno Daniel Soares, 383f.: il, 2007.
- SOUSA NETO, Eráclito Rodrigues de. **Fluxos de óxido nitroso (N₂O), metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) a partir de um solo cultivado com cana-de-açúcar sob diversos tratos culturais**. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-23042013-092611/>. Acesso em: 31 ago. 2024.
- TABATABAI, M. A. Soil enzymes, in: Weaver, R.W., et al (Eds.), **Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties**. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison. pp. 778– 833, 1994.
- TOLEDO FILHO, D. V.; PARENTE, P. R. Essências indígenas sombreadas. *Silvicultura*, v. 16, p. 984-958, 1982.
- UZAROWICZ, L.; WOLINSKA, A.; BIONSKA, E.; ANNA, S-N.; KUZNIAR, A.; SLODCZYK, Z.; KWASOWSKI, W. Technogenic soils (Technosols) developed from mine spoils containing Fe sulphides: microbiological activity as an indicator of soil development following land reclamation. *Applied Soil Ecology*, v. 156, e103699, 2020.

WALLIS, I. R. et al. Available and not total nitrogen in leaves explains key chemical differences between the eucalypt subgenera. **Forest Ecology and Management**, v. 260, n. 5, p. 814-821, 2010.

WICKHAM, H., AND CHANG, W. **ggplot2': Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics**. R package version 3.1.0. 2020.

VALE, D. W. **Manejo da palha, adubação nitrogenada, potássica e uso de inoculante em soca de cana-de-açúcar**. 2013. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2013.

VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. A qualidade do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 743-755, 2009.

VERGNES A.; BLOUIN M.; MURATET A.; LERCH T. Z.; MERCEDES, M. M.; ROUELLE-CASTREC M., FLORENCE, D. Initial conditions during Technosol implementation shape earthworms and ants diversity. **Landscape and Urban Planning**, v. 159, p. 32-41, 2017.

VITTI, A. C. et al. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 287-293, 2011.

VIEIRA, R. F. **Impactos das mudanças climáticas na ocorrência de doenças de plantas em sistemas agrícolas brasileiros**. Brasília, DF: Embrapa, 175460/1/2017LV04.

ZHANG, Yulan et al. Kinetic parameters of soil β -glucosidase response to environmental temperature and moisture regimes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 4, p. 1285- 1291, 2011.

WATKINSON, A. D.; LOCK, A. S.; BECKETT, P. J.; SPIERS, G. Developing manufactured soils from industrial by-products for use as growth substrates in mine reclamation. **Restoration Ecology**, v. 25(4), p. 587-594, 2017.