

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

FELIPE MARTINS DO RÊGO BARROS

**DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS TOTAIS, AMÔNIO-
OXIDANTES E DIAZOTRÓFICOS EM SOLOS SOB SISTEMA
SILVIPASTORIL COM LEGUMINOSAS ARBÓREAS**

RECIFE

2018

Felipe Martins do Rêgo Barros
Engenheiro Agrônomo

Diversidade e abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo

Orientadora: Prof^a. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Dr. Felipe José Cury Fracetto

Coorientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Recife

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

B277d Barros, Felipe Martins do Rêgo
Diversidade e abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas / Felipe Martins do Rêgo Barros. – 2018.
74 f. : il.

Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.
Coorientadores: Felipe José Cury Fracetto, Mario de Andrade Lira Junior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Consórcio gramínea-leguminosa 2. 16 rRNA 3. AOB
4. *nifH* 5. Oxidação do amônio 6. Fixação biológica de nitrogênio
I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, orient. II. Fracetto, Felipe José Cury, coorient. III. Lira Junior, Mario de Andrade, coorient. IV. Título

CDD 631.4

FELIPE MARTINS DO RÊGO BARROS

Diversidade e abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 09 de Março de 2018

Prof^a. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as vitórias conquistadas, por toda paz e amor concedidos a mim.

A minha família, em especial meus pais Pedro Orleans do Rêgo Barros e Rosália Martins do Rêgo Barros, pela educação, pelo amor e carinho que permitiram minha chegada até aqui. Ao meu irmão Arquimedes Martins do Rêgo Barros, por toda força.

A minha amada companheira Larissa Santos Pereira, que sempre esteve ao meu lado durante esse período de provação.

À prof^a. Dra. Giselle Fracetto, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo carinho e amizade. Ao meu amigo e coorientador Dr. Felipe Fracetto, pelo apoio, amizade e colaboração.

Ao prof. Dr. Mario Lira Júnior, pela coorientação e importante contribuição com o trabalho. Ao prof. Dr. Emídio Cantídio de Oliveira, pela colaboração na etapa de análises químicas do trabalho.

Ao Dr. Herbert Siqueira e toda equipe do laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE, pelo apoio à realização das análises em qPCR.

Aos amigos e irmãos de orientação, Victor Lucas, Tiago Santos, Aline Mesquita, Eliabe Freitas, Lucía Nuñez e, especialmente, a José Petrônio, que foi peça fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Robson Lima, por todo apoio durante as análises químicas.

A todos os amigos da pós-graduação, Abraão Cícero, Adriana Bezerra, Aleksandro Ferreira, Cíntia Gouveia, David Lukas, Emanuelle Silva, Evaniely Costa, Greciele Cavalcante, Janyelle Lemos, Jéssica Oliveira, Juliet Emília, Juscelia da Silva, Leandro Reis, Magda Silva, Mariana Silva, Marilya Sousa, Mayame Brito, Sueide Karina, Thaís Fernandes, Vinicius dos Santos, Vitória Silva; com desculpas aos que não foram citados.

À Socorro Santana, por toda disponibilidade e presteza.

Aos meus amigos, Patrícia Bezerra, Thaís Almeida, Jhônatha David, Leonam Silva, Andrey Silva e Edilton, que me acolheram durante toda minha jornada acadêmica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Diversidade e abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas

RESUMO

Uma forma de evitar a degradação de pastagens, ou recuperar pastagens degradadas, é o uso do consórcio de leguminosas com gramíneas forrageiras, em sistema silvipastoril. Além do aporte de nitrogênio via simbiose leguminosa-rizóbio, a melhoria das qualidades do solo intensifica a atuação de bactérias de vida livre capazes de fixar N₂ e bactérias nitrificantes. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a nitrificação são processos microbianos chave do ciclo do N no solo. Estes podem ser estudados com base em genes indicadores, como o gene *nifH*, ou regiões específicas do 16S rRNA. O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas sobre a estrutura, diversidade e abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos e suas relações com os atributos químicos do solo. A área de estudo fica situada na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em Itambé, PE, Brasil. O clima do local é tropical subúmido e os solos predominantes são classificados como argissolo. O experimento é composto por nove parcelas de 1 ha com leguminosas arbóreas, sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e gliricídia (*Gliricidia sepium*), além da braquiária solteira (*Brachiaria decumbens*), em delineamento em blocos ao acaso com três tratamentos: braquiária + sabiá; braquiária + gliricídia e braquiária solteira, com três repetições. As amostras foram coletadas nas estações seca e úmida. Nos tratamentos com consórcio as amostras foram coletadas a zero (0 m), quatro (4 m) e oito metros (8 m) a partir das leguminosas; enquanto na braquiária solteira as amostras foram coletadas aleatoriamente. A estrutura das comunidades de Bacteria, bactérias amônio oxidantes e diazotróficos nos diferentes tratamentos foi avaliada por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) e os genes foram quantificados por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A diversidade e equitabilidade das comunidades microbianas foram estimadas pelos índices de Shannon, Simpson e Pielou. A estrutura das comunidades de bactérias totais, AOB e diazotróficos do solo foi influenciada pelo sistema silvipastoril, apresentando diferentes comunidades entre as distâncias a partir das leguminosas, com maiores dissimilaridades na estação úmida. As comunidades de diazotróficos mostraram maior diversidade e equitabilidade sob sistema silvipastoril. Observou-se maior abundância no sistema silvipastoril, onde bactéria total e diazotróficos foram mais abundantes na estação seca. O teor de fósforo disponível no solo se correlacionou positivamente com o número de cópias do gene *nifH* no consórcio de braquiária + sabiá durante a estação seca, enquanto o teor de amônio apresentou correlação negativa na estação úmida. A capacidade de troca de cátions se correlacionou positivamente à abundância de AOB no consórcio braquiária + gliricídia na estação seca. O manejo silvipastoril com leguminosas arbóreas melhora a qualidade biológica do solo por favorecer a comunidade microbiana ligada à ciclagem do N.

Palavras-chave: Consórcio gramínea-leguminosa. 16 rRNA. AOB. *nifH*. Oxidação do amônio. Fixação biológica de nitrogênio.

Diversity and abundance of total bacteria, ammonium-oxidizing and diazotrophic in soils under silvopastoral system with tree legumes

ABSTRACT

Intercropping tree legumes with forage grasses in silvopastoral system is an alternative to avoid pastures degradation or recovering degraded pastures. In addition to allowing the nitrogen supply through the legume-rhizobium symbiosis, the improvement of the soil qualities enhances the action of free-living bacteria, fixing N₂. Biological nitrogen fixation (BNF) and nitrification are key microbial processes of the N-cycle in soil and both can be studied based on indicator genes, such as the *nifH* gene, or specific regions of the 16S rRNA. This work evaluated the influence of the silvopastoral system with tree legumes on the structure, diversity and abundance of the community of total bacteria, ammonium-oxidizing bacteria and diazotrophic organisms and their relationship to soil chemical attributes. The study area is located at the Experimental Station from Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), in Itambé city, Pernambuco state, Brazil, which the climate is tropical subhumid and the predominant soils are classified as Ultisols. The experiment had nine plots of one hectare with tree legumes Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) and Gliricídia (*Gliricidia sepium*), and a single Brachiaria (*Brachiaria decumbens*), in a randomized block design with three treatments: Brachiaria intercropping Sabia; Brachiaria intercropping Gliricídia and single Brachiaria, with three replicates. The samples were collected in wet and dry climatic seasons. In the consortium treatments the samples were collected at zero (0 m), four (4 m) and eight meters (8 m) from the legumes; while in single brachiaria the samples were randomly collected. The structure of the total bacteria communities, ammonium-oxidizing bacteria and diazotrophic organisms was evaluated by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) and the genes were quantified by qPCR (real time quantitative PCR). The diversity and equitability of the microbial communities were estimated by the Shannon, Simpson and Pielou indices. The soil structure of the total bacterial, AOB and diazotrophic communities was influenced by the silvopastoral system, presenting different communities among the distances from the legumes, with greater dissimilarities in the wet season. The diazotrophic communities showed greater diversity and equitability under the silvopastoral system. The silvopastoral system presented a greater abundance of microorganisms, which of total bacteria and diazotrophic were more abundant in the dry season. The available phosphorus content correlated positively to the copies number of the *nifH* gene in the brachiaria with sabia intercropping, during the dry season, while the ammonium content presented negative correlation in the wet season. The cation exchange capacity correlated positively to the AOB abundance in the brachiaria with gliricidia intercropping in the dry season. Silvopastoral system with tree legumes improves the soil biological quality by favoring the microbial community linked to the N cycling.

Keywords: Grass-legume intercrops. Brachiaria. 16 rRNA. AOB. *nifH*. Ammonium-oxidizing. Biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização da área de estudo e imagens aéreas do campo experimental32
- Figura 2.** Representação da parcela experimental e distribuição dos transectos para coleta de solo em pastagem consorciada com leguminosas em Pernambuco32
- Figura 3.** Detalhe dos pontos de coleta de solos nos transectos ao longo de uma parcela experimental com consórcio gramínea + leguminosa.....32
- Figura 4.** Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) a zero metros das leguminosas em solos sob sistema silvipastoril. B: Braquiária; B+S: Braquiária + Sabiá; B+G: Braquiária + Gliricídia, R: repetições; M: marcador.....42
- Figura 5.** Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril na estação seca. B: Braquiária: 1, 2, 3; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros: 4, 5, 6; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros: 7, 8, 9; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros: 10, 11, 12; B+S0m: Braquiária + Sabiá a zero metros: 13, 14, 15; B+S4m: Braquiária + Sabiá a quatro metros: 16, 17, 18; B+S8m: Braquiária + Sabiá a oito metros: 19, 20, 21; R: repetições; M: marcador45
- Figura 6.** Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida. B: Braquiária: 1, 2, 3; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros: 4, 5, 6; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros: 7, 8, 9; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros: 10, 11, 12; B+S0m: Braquiária + Sabiá a zero metros: 13, 14, 15; B+S4m: Braquiária + Sabiá a quatro metros: 16, 17, 18; B+S8m: Braquiária + Sabiá a oito metros: 19, 20, 21; R: repetições; M: marcador47
- Figura 7.** Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril e sob braquiária em cultivo solteiro. B+L: consórcio gramínea + leguminosa (média das distâncias); B+L 0 m: faixa de leguminosas, B: braquiária solteira. Barras de erro representam o erro padrão da média (n=3). Barras

com letras diferentes, em cada gráfico, diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de t.....53

Figura 8. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total em solos sob sistema silvipastoril a diferentes distâncias a partir das leguminosas, em estações climáticas distintas. Modelo: Componentes de variância, AIC = 0,7. Barras da mesma cor seguidos de letras maiúsculas idênticas, ou barras de cores diferentes seguidas por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey54

Figura 9. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (a) e do gene nifH de diazotróficos (b) em solos sob sistema silvipastoril em diferentes distâncias a partir das leguminosas. Modelo: Componentes de variância, AIC = 0,7. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey54

Figura 10. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene nifH de diazotróficos (c) em estações climáticas distintas. Barras de erro representam o erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes, em cada gráfico, diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de t.....56

Figura 11. Análise de Componentes Principais (biplot) baseada nos dados de qPCR, DGGE e atributos químicos do solo sob sistema silvipastoril com Gliricídia na estação seca (a) e úmida (b). Os símbolos representam as amostras (B: Braquiária; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros). As setas pontilhadas representam os atributos químicos do solo. As setas contínuas representam as comunidades microbianas (16S: Bacteria; AOB: Bactérias amônio oxidantes; nifH: Diazotróficos) 58

Figura 12. Análise de Componentes Principais (biplot) baseada nos dados de qPCR, DGGE e atributos químicos do solo sob sistema silvipastoril com Sabiá na estação seca (a) e úmida (b). Os símbolos representam as amostras (B: Braquiária; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros). As setas pontilhadas representam os atributos químicos do solo. As setas contínuas representam as comunidades microbianas (16S: Bacteria; AOB: Bactérias amônio oxidantes; nifH: Diazotróficos).58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem usados para amplificar os genes alvo..	37
Tabela 2. Atributos físicos dos solos sob sistema silvipastoril	38
Tabela 3. Atributos químicos dos solos sob sistema silvipastoril na estação seca ...	39
Tabela 4. Atributos químicos dos solos sob sistema silvipastoril na estação úmida.	40
Tabela 5. Contrastes ortogonais e comparações entre os manejos e as diferentes estações climáticas (Seca e Úmida) para os atributos químicos do solo	41
Tabela 6. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) dos genes 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene <i>nifH</i> de diazotróficos a zero metros das leguminosas em solos sob sistema silvipastoril.	43
Tabela 7. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene <i>nifH</i> de diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação seca	46
Tabela 8. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene <i>nifH</i> de diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida	49
Tabela 9. Contrastes ortogonais e comparação entre os diferentes manejos e estações climáticas para Dominância (D), diversidade (H') e equitabilidade (E) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos	50
Tabela 10. Valores dos índices de Dominância (D), diversidade (H') e equitabilidade (E) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação seca	51
Tabela 11. Valores dos índices de Dominância (D), diversidade (H') e equitabilidade (E) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Hipótese.....	18
1.2 Objetivo geral.....	18
1.3 Objetivos específicos.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Pastagens no mundo e no Brasil.....	19
2.2 Pastagens degradadas e sua recuperação.....	19
2.3 Dinâmica do nitrogênio em pastagens tropicais.....	22
2.4 Fixação biológica de nitrogênio.....	23
2.5 Oxidação do amônio (Nitrificação).....	25
2.6 PCR-DGGE e qPCR aplicadas ao estudo de comunidades microbianas em solos.....	26
2.7 Efeito da cobertura vegetal e das características do solo sobre as comunidades microbianas.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Área de Estudo e Amostragem.....	31
3.2 Análise dos atributos físicos e químicos do solo.....	33
3.3 Extração de DNA do solo.....	33
3.4 Análise de amplicons em eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE).....	33
3.5 Quantificação de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos por PCR em tempo real (qPCR).....	35
3.6 Análises estatísticas.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Atributos físicos e químicos do solo.....	38
4.2 Efeito da introdução de leguminosas arbóreas sobre a estrutura das comunidades microbianas.....	41
4.3 Efeito do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas sobre a estrutura e diversidade das comunidades microbianas.....	43
4.3.1 Estrutura das comunidades microbianas.....	43
4.3.2 Diversidade das comunidades microbianas.....	49
4.4 Efeito do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas sobre a abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos.....	52

4.5 Efeito da estação climática sobre a abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos.....	55
4.6 Análise de componentes principais (PCA) e correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas	56
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS	60
7. APÊNDICES.....	73

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque na pecuária mundial, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo e o detentor do segundo maior rebanho atualmente. A maior parte desse rebanho é alimentada exclusivamente a pasto. Nesse cenário, é possível observar a importância das pastagens para a economia do país, apesar dos problemas relacionados a sua degradação.

A utilização do consórcio de leguminosas arbóreas (família Fabaceae) com gramíneas forrageiras em sistema silvipastoril é uma maneira de elevar o teor de nutrientes no solo, principalmente o nitrogênio por meio da fixação biológica oriunda da simbiose leguminosa-rizóbio. Esse manejo tem sido utilizado com sucesso na recuperação de pastagens degradadas e na manutenção da qualidade do pasto, com resultados conhecidos sobre a qualidade química do solo, enquanto informações sobre sua influência nas comunidades microbianas do solo são incipientes.

Os micro-organismos do solo são sensíveis às mudanças ambientais, podendo ser utilizados como indicadores de qualidade do solo. A composição e as práticas de manejo adotadas na agricultura estão entre os fatores responsáveis pela estruturação das comunidades de bactérias do solo, onde o efeito das plantas tem sido observado principalmente na rizosfera, local onde há influência direta dos exsudados radiculares. Além da cobertura vegetal, a comunidade de bactérias do solo também é influenciada pelas características físico-químicas do mesmo (teor de nutrientes, umidade, temperatura, entre outras), as quais apresentam variações de acordo com a estação do ano.

As transformações do nitrogênio no solo são dependentes de reações de oxirredução mediadas por micro-organismos. Dentre essas reações estão as que ocorrem na fixação biológica de nitrogênio (FBN) e na nitrificação, etapas chave do ciclo do N onde há a atuação direta de bactérias e Archaeas. Na FBN, o nitrogênio atmosférico (N_2) é reduzido a amônio (NH_4^+) principalmente em nódulos radiculares formados pela simbiose leguminosa-rizóbio e por organismos diazotróficos de vida livre presentes no solo. Isso só é possível graças à atuação do complexo enzimático nitrogenase, que catalisa a redução do dinitrogênio (N_2) à amônia (NH_3), a qual é assimilada na forma de aminoácidos. O nitrogênio é devolvido ao solo após a morte dos micro-organismos e mineralização do N orgânico. Na nitrificação, grupos

específicos de bactérias, na presença de oxigênio, oxidam sequencialmente o NH_4^+ à nitrato (NO_3^-).

As avaliações da estrutura, diversidade e abundância da comunidade microbiana do solo podem ser realizadas por técnicas dependentes ou independentes de cultivo. No que se refere às técnicas moleculares, independentes de cultivo, o gene 16S rRNA tem sido muito utilizado para o estudo de bactérias no solo por possuir regiões variáveis e altamente conservadas. Os diazotróficos podem ser estudados por meio dos genes *nif*, responsáveis por codificar as subunidades do complexo nitrogenase. Já as bactérias amônio oxidantes (AOB) podem ser estudadas utilizando-se regiões específicas do gene 16S rRNA de AOB pertencentes a subdivisão β -proteobacteria como marcador molecular.

1.1 Hipótese

A prática do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas determina a estrutura, diversidade e abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos, que também são influenciadas pela sazonalidade climática e características químicas do solo.

1.2 Objetivo geral

Avaliar as alterações da estrutura, diversidade e abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas e determinar o efeito dos atributos químicos do solo sobre essas comunidades microbianas.

1.3 Objetivos específicos

Avaliar a estrutura, diversidade e abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos em função da distância das linhas de leguminosas no sistema silvipastoril;

Avaliar estrutura, diversidade e abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos em duas estações climáticas distintas;

Correlacionar a abundância das comunidades de bactérias totais, amônio oxidantes e diazotróficos aos atributos químicos do solo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pastagens no mundo e no Brasil

As pastagens (prados e pastagens permanentes) recobrem a área de 32,7 milhões de quilômetros quadrados, o que corresponde a 25,18% da área continental da Terra. No panorama mundial, a Ásia, África e América destacam-se como as regiões do globo com maior área coberta por pastagens, totalizando cerca de 1082, 861 e 826 milhões de hectares, respectivamente (FAO, 2015).

No Brasil há cerca de 174 milhões de hectares cobertos por pastagens nativas e cultivadas, o que corresponde a 20% da área do território nacional (LOBATO et al., 2014). As espécies de gramíneas forrageiras cultivadas mais importantes foram introduzidas da África, destacando-se os gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Andropogon* (MACEDO, 2009). As gramíneas do gênero *Brachiaria* são caracterizadas por seu valor forrageiro e por tolerarem condições de solos ácidos e de baixa fertilidade, comuns nas áreas de pecuária extensiva, sistema predominante no Brasil, onde o uso de fertilizantes é restrito (SILVA et al., 2010). Cerca de 85% da área de pastagens do país é ocupada por este gênero, onde a espécie *Brachiaria decumbens* Stapf. ocupa aproximadamente 55% desse percentual (MARTUSCELLO et al., 2009).

Parte do sucesso da pecuária do Brasil, segundo maior rebanho de bovinos e maior exportador de carne bovina do mundo (IBGE, 2014; USDA, 2017), é atribuído às pastagens, já que aproximadamente 90% do rebanho bovino é alimentado exclusivamente a pasto (GUARDA; GUARDA, 2014), o que evidencia a importância das pastagens para a economia do país, apesar dos problemas relacionados a sua degradação.

2.2 Pastagens degradadas e sua recuperação

Estima-se que 70% das pastagens no Brasil apresentam algum grau de degradação, um dos maiores problemas do setor pecuário, sendo principalmente relacionada ao manuseio inadequado, com perdas econômicas e ambientais (GALDINO et al., 2015). O processo de degradação de pastagens está associado a fatores como superlotação e falta de adubações periódicas. A baixa disponibilidade de nutrientes no solo, destacando-se o nitrogênio (N) e o fósforo (P), e a elevada

saturação por alumínio (m) são uns dos principais fatores que afetam a produtividade e qualidade das forragens, onde o nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento das gramíneas forrageiras (NOGUEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2013a).

Este processo reflete nas qualidades químicas, físicas e microbiológicas do solo e a deficiência de nitrogênio é responsável pelo início do processo de degradação. A elevada relação C:N, teor de lignina e N insolúvel em detergente ácido no tecido senescente das gramíneas tropicais, ao ser depositado ao solo, resulta na imobilização microbiana do N inorgânico e redução da mineralização do N orgânico do solo, reduzindo sua disponibilidade para as plantas, causando o declínio da pastagem (VENDRAMINI et al., 2007). A diminuição da produção vegetal afeta a formação de serapilheira (fonte de matéria orgânica do solo), tornando o solo susceptível à compactação (BODDEY et al., 2000).

A sustentabilidade do ecossistema é dependente do fluxo de nutrientes ao longo dos níveis tróficos, mediado principalmente por micro-organismos. Dessa forma, a comunidade microbiana do solo é essencial na decomposição da matéria orgânica, no ciclo dos nutrientes e nas mudanças de propriedades físicas e químicas do solo, sendo facilmente afetada pelo uso e manejo do mesmo (SANTOS et al., 2015). De acordo com Thomas (1992), para atingir a sustentabilidade em sistemas de pastagens tropicais é essencial a introdução de leguminosas que fazem associação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

A utilização do consórcio de leguminosas arbóreas com gramíneas forrageiras, sistema denominado silvipastoril, é uma maneira de evitar a degradação do pasto, ou recuperar pastagens degradadas, além disso, as leguminosas integradas no sistema oferecem benefícios ambientais e econômicos. A deposição e decomposição da biomassa das leguminosas promove aumentos no conteúdo de matéria orgânica e nutrientes no solo, proporcionando condições favoráveis ao desenvolvimento da fauna do solo pela diminuição da relação C:N, além do sombreamento das plantas criar um microclima favorável ao desenvolvimento de organismos (XAVIER et al., 2011). A integração de leguminosas arbóreas na pastagem melhora a dieta alimentar do gado pelo fornecimento de forragem com elevado teor de proteína bruta proveniente da leguminosa, adiciona nitrogênio ao sistema pela fixação biológica, além de poder gerar renda com o fornecimento de madeira comercial com a adoção de espécies adequadas (APOLINÁRIO et al., 2015).

Nesse sistema, o N fixado pelas leguminosas é transferido para as gramíneas por meio da excreta do gado, via exsudação de N pelas raízes e nódulos, senescência e decomposição de nódulos e raízes, transferência direta a partir de conexões entre as raízes das leguminosas e gramíneas feitas por hifas de fungos micorrízicos e decomposição da liteira depositada ao solo (VENDRAMINI et al., 2014).

A escolha das leguminosas deve levar em consideração a adaptação edafoclimática das plantas, sua aceitabilidade pelos animais, a velocidade de crescimento e competição com a pastagem, além da capacidade de fornecer produtos alternativos (como madeira) e fixar nitrogênio (APOLINÁRIO et al., 2016). Dias, Souto e Franco (2007), analisando o comportamento de 16 espécies de leguminosas arbóreas introduzidas em pasto de *Brachiaria decumbens*, observaram que *Gliricidia sepium* (gliricídia) e *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) estavam entre as espécies mais consumidas pelos animais. Silva et al. (2013a), avaliando o estoque de serrapilheira e a fertilidade do solo em pastagens degradadas de *B. decumbens*, após implantação de leguminosas arbustivas e arbóreas forrageiras, verificaram que gliricídia e sabiá depositaram grande quantidade de serrapilheira ao solo (440 e 1560 kg ha⁻¹, respectivamente), com teores de N de 11,4 g kg⁻¹ e 12,3 g kg⁻¹ respectivamente. Silva et al. (2013b), avaliando as mudanças no uso do solo na microrregião do Brejo Paraibano e sua influência sobre propriedades físicas e químicas do mesmo em áreas sob diferentes coberturas vegetais, concluíram que os atributos químicos do solo se apresentaram mais adequados na área cultivada com sabiá, em relação às áreas de mata nativa e pastagem.

A gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.) é uma árvore nativa da América Central e do Sul, pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae. Foi introduzida no Nordeste do Brasil na década de 1980 para o uso como forrageira e planta medicinal. Destaca-se pela sua tolerância à seca, pelo rápido crescimento e fácil propagação por sementes (REIS et al., 2012). O sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, ocorrendo naturalmente no Nordeste do Brasil, em áreas da caatinga do Piauí, Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia e Ceará. Apresenta rápido crescimento e resistência à seca (MENDES et al., 2013).

2.3 Dinâmica do nitrogênio em pastagens tropicais

O nitrogênio é um dos nutrientes mais absorvidos e exportados pelas plantas e um dos principais limitantes ao crescimento e produção vegetal em solos tropicais (GIMENES et al., 2017). No solo, o N encontra-se contido nos resíduos vegetais, na biomassa microbiana e húmus (mais de 95% do N total do solo), e como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), além de em baixas concentrações como nitrito (NO_2^-) (CAMERON; DI; MOIR, 2013).

As entradas de N no solo podem ocorrer por deposição atmosférica, fixação biológica de N_2 , decomposição de resíduos animais e vegetais e aplicação de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Em ecossistemas de pastagens tropicais, as principais formas de entrada de N são a decomposição de resíduos vegetais e deposição de excretas animais. Em pastagens consorciadas com leguminosas a fixação biológica de N, oriunda da simbiose leguminosa-rizóbio, pode contribuir com em média 50 kg ha^{-1} de N anualmente (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008).

Dados de Apolinário et al. (2015) mostram que gliricídia e sabiá são capazes de contribuir mensalmente com 6 e 9 kg ha^{-1} de N, respectivamente, por meio da fixação biológica em sistema de consórcio com braquiária na mesorregião da Mata de Pernambuco. Essas espécies podem ser noduladas por diversas bactérias diazotróficas (FLORENTINO et al., 2014; OLIVEIRA, 2011), havendo registros confirmados da simbiose entre gliricídia e bactérias do gênero *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e entre sabiá e bactérias do gênero *Burkholderia* (COELHO et al., 2018; MARTINS et al., 2015).

Após a senescência das folhas e morte das raízes, o N orgânico contido no tecido das plantas é convertido a N mineral por meio do processo de mineralização, onde micro-organismos utilizam os compostos nitrogenados contendo carbono como fonte de energia na respiração e os convertem em formas inorgânicas passíveis de serem absorvidas pelas plantas. Caso o teor de N presente nos resíduos vegetais não satisfaça os requisitos nutricionais para o crescimento microbiano, característica comum da liteira formada por gramíneas forrageiras tropicais, o N inorgânico do solo é absorvido pelas comunidades microbianas no processo de imobilização (CHEN et al., 2014).

As bactérias são fundamentais na mineralização do N, atuando por meio da produção de exoenzimas, como as proteases, que agem na despolimerização de

proteínas, primeira fase da mineralização. Entre as principais proteases microbianas estão as serinas endopeptidases e cisteínas endopeptidases, produzidas por bactérias abundantes no solo, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (VRANOVA, REJSEK, FORMANEK, 2013). Após a despolimerização, os aminoácidos são desaminados produzindo NH_3 e compostos orgânicos intermediários por amonificação (GAO et al., 2017). De acordo com Weidner et al. (2015) a maior diversidade bacteriana na rizosfera das plantas pode aumentar a atividade proteolítica no solo, elevando a mineralização do N, resultando em maiores concentrações de N disponível para as plantas.

As perdas de N por desnitrificação, redução bioquímica de formas oxidadas de N a formas gasosas (N_2 e N_2O) realizada por bactérias anaeróbias facultativas, são promovidas por condições de alta umidade, baixa taxa de difusão de oxigênio e presença de substrato solúvel (matéria orgânica e NO_3^-). Em solos sob pastagens, as taxas de desnitrificação são frequentemente baixas, reflexo da reduzida disponibilidade de NO_3^- (LUO et al., 1999). O óxido nitroso (N_2O) também é formado como um subproduto do processo de nitrificação (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010), enquanto o N_2 também é formado pelo processo de oxidação anaeróbica do amônio (ANAMMOX) (SONTHIPHAND; HALL; NEUFELD, 2014).

A fixação biológica de N e o processo de nitrificação, etapas chave do ciclo do N no solo nas quais concentra-se o presente trabalho, estão descritas em mais detalhes adiante.

2.4 Fixação biológica de nitrogênio

Apesar de ser um dos elementos mais abundantes na Terra, compondo 80% da atmosfera, o nitrogênio gasoso (N_2) não é diretamente assimilado pelas plantas. O N_2 é composto por dois átomos ligados de forma covalente por seis elétrons, formando uma ligação tripla altamente estável que precisa ser quebrada para que o nutriente seja assimilado. O N biodisponível é aquele ligado ao oxigênio, carbono ou hidrogênio, chamado de N reativo. As plantas absorvem o N do solo na forma de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), predominantemente (GARCIA; CARDOSO, 2013; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

O uso de leguminosas capazes de se associar às bactérias diazotróficas e disponibilizar N tem sido uma prática comum em muitas culturas e pastagens tropicais.

Nos nódulos radiculares, induzidos pela simbiose entre rizóbios e leguminosas, o nitrogênio atmosférico, na forma de N_2 , é convertido a amônio (NH_4^+) e assimilado pelas plantas (ASHWORTH et al., 2015).

A capacidade de fixar nitrogênio é amplamente distribuída nos domínios Bacteria e Archaea. Todavia, a maioria dos organismos diazotróficos conhecidos pertence ao domínio Bacteria (DIXON; KAHN, 2004). Além dos rizóbios, diversas bactérias de vida livre (assimbióticas) também são capazes de fixar N_2 , contribuindo para o aporte de nitrogênio disponível para as plantas no solo em condições em que as bactérias fixadoras simbióticas estão ausentes ou inativas (WURZBURGER et al., 2012). Dentre as bactérias fixadoras de N de vida livre podemos encontrar anaeróbias (como *Clostridium*), aeróbias facultativas (como *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacillus*) e aeróbias (como *Azotobacter*). As archaeas capazes de fixar nitrogênio pertencem ao filo Euryarchaeota, as quais são comumente encontradas em ambientes anóxicos (HU et al., 2013; LIU; PENG; LI, 2012).

Diversos fatores ambientais ligados ao solo podem afetar a FBN. Condições de estresse, como restrição hídrica, salinidade e elevadas temperaturas podem ter efeitos negativos sobre a planta hospedeira e bactéria simbiótica, reduzindo a nodulação e, conseqüentemente, a fixação de N (HUNGRIA; VARGAS, 2000; MOHAMMADI et al., 2012); enquanto em vida livre, a disponibilidade de nutrientes no solo é o principal fator limitante à FBN (DYNARSKI; HOULTON, 2017).

Os procariotos capazes de fixar nitrogênio atmosférico utilizam o complexo enzimático nitrogenase para catalisar a redução do dinitrogênio (N_2) à amônia (NH_3) (KEUTER; VELDKAMP; CORRE, 2014). O complexo nitrogenase é composto por dois componentes, consistindo de uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína), também chamada de dinitrogenase, onde ocorre a redução do N_2 , e uma ferro-proteína (Fe-proteína), também chamada de dinitrogenase redutase, responsável pela transferência de elétrons para a dinitrogenase. A energia consumida no processo de redução do N_2 é gerada pela hidrólise do ATP. A dinitrogenase possui dois grupos de metais que atuam como cofatores: o cofator $[8Fe:7S]-P$ que atua no transporte de elétrons e o cofator FeMoCo que é o local de redução do substrato. A redução do N_2 a NH_3^+ ocorre com a seguinte reação: $N_2 + 10 H^+ + 8e^- + 16 ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P_i$ (HOFFMAN et al., 2014; SPATZAL et al., 2016).

As subunidades do complexo nitrogenase são codificadas pelos genes *nif*. A MoFe-proteína é codificada pelos genes *nifD* e *nifK*, enquanto a Fe-proteína é

codificada pelo gene *nifH* (IVLEVA et al., 2016). Dentre os três genes, o *nifH* é o principal gene marcador em pesquisas que avaliam filogenia, diversidade e abundância de micro-organismos fixadores de nitrogênio, havendo muitos iniciadores (*primers*) específicos desenvolvidos para a amplificação de fragmentos desse gene a partir de amostras ambientais (GABY; BUCKLEY, 2012).

2.5 Oxidação do amônio (Nitrificação)

No solo, parte do NH_4^+ é absorvido pelas plantas e parte é convertido a NO_3^- . Grupos específicos de bactérias e archaeas, na presença de oxigênio, oxidam sequencialmente o NH_4^+ a NO_3^- num processo chamado de nitrificação. Inicialmente o NH_4^+ é oxidado à hidroxilamina por organismos que contêm a enzima amônio monooxigenase. Posteriormente, a hidroxilamina é oxidada à nitrito (NO_2^-) pela enzima hidroxilamina óxido redutase. Finalmente o NO_2^- é oxidado à NO_3^- pela enzima nitrito oxireductase (CANFIELD et al., 2010).

Dentre as bactérias que oxidam NH_4^+ a NO_2^- (nitritação) encontram-se *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira*. Dentre as que oxidam nitrito a nitrato estão: *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZI, 2016). Recentemente, Daims et al. (2015) demonstraram que bactérias do gênero *Nitrospira*, classificadas como '*Candidatus Nitrospira inopinata*', são capazes de oxidar NH_4^+ a NO_3^- em um único passo.

A enzima amônio monooxigenase é constituída por três subunidades, codificadas pelo operon funcional *amo*. O sítio ativo da enzima é codificado pelo gene *amoA* (GONZALEZ et al., 2012). As Bactérias Amônio Oxidantes (AOB) apresentam reduzidas taxas de crescimento e suas necessidades para o crescimento ainda não são totalmente conhecidas, sendo de difícil cultivo em meios artificiais. Dessa forma, têm-se utilizado técnicas moleculares, independentes de cultivo, capazes de detectar esses organismos por meio do monitoramento do gene *amoA* (DIAS et al., 2012). Alternativamente, regiões específicas do gene 16S rRNA de AOB da subdivisão β -proteobacteria, a qual pertencem os gêneros *Nitrosomonas* and *Nitrospira*, são utilizadas como marcadores moleculares (KOWALCHUK et al., 1997; TOURNA et al., 2008).

Vários fatores ambientais influenciam a nitrificação no solo. Entre os principais estão a disponibilidade de subsatrato (NH_4^+), pH, umidade, aeração e temperatura. A

disponibilidade de substrato é fator crucial para nitrificação, a qual tem influencia direta do pH do solo (LI et al., 2018). Solos com baixo teor de matéria orgânica, ou matéria orgânica com alta relação C:N, podem apresentar reduzida taxa de nitrificação pela baixa disponibilidade de NH_4^+ . Dentre os fatores físicos, umidade e aeração são os mais críticos, onde a nitrificação é restrita em solos com elevada umidade devido a reduzida aeração (SAHRAWAT, 2008).

2.6 PCR-DGGE e qPCR aplicadas ao estudo de comunidades microbianas em solos

Os processos chave ligados ao ciclo do nitrogênio são dependentes da atuação de micro-organismos e a caracterização da comunidade microbiana e suas funções pode ser realizada por meio de uma variedade de metodologias com diferentes níveis de resolução (LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014). As variáveis microbianas quantificáveis têm sido convencionalmente determinadas usando métodos baseados em extração, isolamento e contagem de colônias. No entanto, sabe-se que menos de 1% do total dos micro-organismos do solo podem ser cultivados pelos métodos clássicos, que muitas vezes são laboriosos e requerem longos tempos de incubação. Para superar estas limitações, têm-se utilizado cada vez mais abordagens moleculares, tais como técnicas de *fingerprinting* baseadas no DNA ou RNA extraídos diretamente do solo, que fornecem uma visão da estrutura e composição das comunidades microbianas, e técnicas quantitativas como PCR em tempo real (qPCR), que permitem determinar a abundância de uma população microbiana (BRESSAN et al., 2015).

O principal alvo das técnicas moleculares nos estudos de diversidade microbiana e abundância de micro-organismos são as sequências de rRNA, em especial, no estudo de procariotos, o 16S rRNA (VĚTROVSKY; BALDRIAN, 2013). O 16S rRNA é um gene universal presente em todos os procariotos, que possui cerca de 1550 pb, com regiões hipervariáveis intercaladas com regiões altamente conservadas filogeneticamente (PATWARDHAN; RAY; ROY, 2014).

A estratégia utilizada pelas técnicas de *fingerprinting* de comunidades microbianas consiste na extração de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), posterior amplificação de genes de interesse e, por fim, análise dos produtos de PCR por técnicas como Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) (MUYZER,

1999) que permitem a separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com diferentes sequências de pares de bases. Esta separação baseia-se na mobilidade eletroforética das moléculas de DNA parcialmente desnaturadas no gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante, que diminui quando comparada a molécula helicoidal. A migração do DNA é interrompida quando parte da dupla hélice, chamada de domínio de transição, é desnaturada. A variação das sequências de pares de bases nos domínios de transição faz com que o ponto de desnaturação varie, fazendo com que as moléculas parem em posições diferentes no gradiente desnaturante (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Os resultados de DGGE podem ser utilizados para estimar a diversidade de micro-organismos no solo, permitindo calcular os principais índices de diversidade utilizados na avaliação de comunidades de bactérias, como os índices de Simpson e Shannon (HILL et al., 2003; ORR et al., 2011).

O índice de Simpson ou índice de dominância, ou ainda uniformidade, considera que a diversidade é inversamente relacionada à probabilidade de que dois indivíduos tomados ao acaso em uma comunidade pertençam a mesma espécie (SIMPSON, 1949). Já o índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertence um indivíduo escolhido ao acaso em uma comunidade (SHANNON; WEAVER, 1963). No primeiro, a diversidade tende a ser mais alta quanto menor o valor do índice, enquanto no último quanto maior a diversidade maior será o valor índice.

Na última década, as comunidades microbianas que realizam as principais etapas do ciclo do N têm sido analisadas por meio de PCR em tempo real (ZANARDO et al., 2016). A PCR em tempo real foi inicialmente descrita por Higuchi et al. (1993), os quais utilizaram uma câmera de vídeo para monitorar o processo de PCR, permitindo detectar e medir os produtos gerados durante cada ciclo por meio do aumento da fluorescência oriunda da ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA recém-sintetizadas. Atualmente é possível afirmar que a qPCR tem sido crucial em diversas áreas das ciências, apresentando uma série de aplicações, desde a quantificação de DNA à genotipagem (PABINGER et al., 2014).

2.7 Efeito da cobertura vegetal e das características do solo sobre as comunidades microbianas

A avaliação do efeito do cultivo de pastagens do gênero *Brachiaria* sobre a estrutura de comunidades microbianas do solo, por meio de técnicas moleculares, tem sido reportada em uma série de trabalhos. Rodrigues et al. (2013) observaram que o cultivo de pastagem composta por *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* resultou em uma diversidade alfa - número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) em um habitat - significativamente maior e uma menor diversidade beta - heterogeneidade da estrutura da comunidade - quando comparado ao solo sob floresta. Resultados semelhantes foram apresentados por Mendes et al. (2015), onde o cultivo de pastagens em Latossolo do Sudeste da Amazônia resultou em menor diversidade beta temporal (composição da comunidade bacteriana ao longo do tempo) quando comparado à agricultura e floresta nativa; enquanto a diversidade alfa aumentou.

Kuramae et al. (2012), analisando solos sob coberturas vegetais distintas na Holanda, observaram que a abundância de bactérias foi maior nos solos sob floresta decídua quando comparado aos solos sob pastagem. Lima-Perim et al. (2016), avaliando a composição e abundância de Bactérias e Archaeas em solos coletados ao longo de um gradiente de altitude natural na Mata Atlântica brasileira, observaram maior abundância de bactérias do que archaeas.

Apesar do efeito da presença de leguminosas cultivadas sobre a comunidade microbiana do solo ser bastante reportado na literatura, como, por exemplo, o efeito do cultivo de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e do amendoim (*Arachis hypogaea*) (ALVEY et al., 2003), da fava (*Vicia faba*) e da ervilha (*Pisum sativum*) (SHARMA et al., 2005) e da soja (*Glycine max*) (SUGIYAMA et al., 2014), informações sobre influência do cultivo da gliricídia e do sabiá sobre a comunidade microbiana do solo são incipientes.

A comunidade de micro-organismos amônio oxidantes e, conseqüentemente, o processo de nitrificação é fortemente influenciado pela presença de plantas diferindo notavelmente dependendo das espécies vegetais presentes, as quais atuam por meio de variados mecanismos, entre eles, secretando compostos biológicos inibidores de nitrificação, competindo por NH_4^+ com os nitrificantes e alterando a comunidade microbiana do solo (BOWATTE et al., 2015). Bowatte et al. (2011), testando o efeito

de gramíneas de regiões temperadas e tropicais sobre a nitrificação no solo, observaram que *B. decumbens* foi a segunda gramínea que promoveu menor produção de NO_3^- no solo, possivelmente devido a sua capacidade de exsudar inibidores de nitrificação. Por outro lado, o processo de nitrificação aumenta com a presença de leguminosas, o que está associado ao aumento do conteúdo de N mineral nos solos (ROUX et al., 2013).

O efeito da prática do sistema silvipastoril, comparada ao cultivo de pastagem solteira e floresta nativa, sobre a dinâmica da comunidade de bactérias totais e amônio oxidantes (AOB) foi avaliado por Cubillos et al. (2016). Foram observadas diferenças significativas entre as comunidades de bactérias presentes nas diferentes áreas, sendo que as comunidades de bactérias totais (baseado no 16S rRNA) e amônio oxidantes (baseado no gene *amoA*) dos solos sob sistema silvipastoril e floresta nativa foram mais similares entre si do que as mesmas comunidades no sistema silvipastoril e pastagem solteira.

Tem sido demonstrado que a estrutura das comunidades microbianas apresenta variações sazonais, onde a diversidade microbiana do solo tem correlação com a umidade e temperatura do mesmo, que variam com a estação do ano (LAUBER et al., 2013). Cenciani et al. (2009), avaliando a estrutura da comunidade de bactérias em uma área de coabitação de *Brachiaria brizantha* com espécies florestais arbóreas (área de pousio) comparada com áreas cobertas por floresta nativa e *B. brizantha* solteira na Amazônia, observaram que a estrutura da comunidade de bactérias foi totalmente distinta entre as áreas estudadas na estação seca, enquanto na estação chuvosa a área de pastagem solteira compartilhou as mesmas populações bacterianas com as áreas de pousio e floresta nativa.

Diallo et al. (2004) avaliaram a diversidade bacteriana em solos cultivados com pastagens tropicais sob *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* em Senegal, em duas diferentes épocas de amostragem, e observaram maior porcentagem de clones de Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria na estação chuvosa. Orr et al. (2011), estudando a diversidade de bactérias diazotróficas de vida livre em solos sob diferentes sistemas de rotação de culturas na Inglaterra, obtiveram correlação negativa entre a diversidade do gene *nifH* (baseada nos perfis de DGGE) e os teores de NO_3^- e NH_4^+ no inverno (estação fria e seca), enquanto no outono (estação quente e úmida) observaram correlação positiva.

As leguminosas exsudam grandes quantidades de compostos orgânicos, como açúcares, aminoácidos (como as betaínas) e ácidos orgânicos, que servem como fonte de carbono e energia para os micro-organismos presentes no solo e afetam a expressão de alguns genes ligados ao ciclo do N, agindo como indutores da atuação desses organismos (CERRO et al., 2015; JANCZAREK et al., 2015). Sugiyama et al. (2014) analisaram as comunidades bacterianas em solo rizosférico e no solo não rizosférico (a 20 cm de distância das plantas) durante o crescimento da soja e observaram maior abundância de bactérias, com base no número de cópias do 16 S rRNA, e maior abundância relativa de unidades taxonômicas operacionais na rizosfera. Além disso, a melhoria da qualidade química do solo sob a copa das leguminosas é outro fator que pode induzir a atuação da microbiota (SILVA et al., 2013a). Com isso, é possível que a abundância e o perfil dos micro-organismos ligados ao ciclo do N em solos sob o consórcio de leguminosas com gramíneas forrageiras sejam afetados pela distância a partir das leguminosas.

As comunidades microbianas do solo não são determinadas apenas pela comunidade de plantas que colonizam o solo. Kuramae et al. (2012) observaram que as principais diferenças nas comunidades de bactérias não estavam relacionadas aos tipos de uso de terra, mas sim às características físico-químicas dos solos. Utilizando estatística multivariada, Qu et al. (2016) relacionaram as características físico-químicas dos solos aos resultados de DGGE e verificaram que os principais fatores que determinaram a composição das comunidades de bactérias foram a relação N/P, a condutividade elétrica (CE), pH, Carbono Orgânico (CO) e a relação C/N.

Sendo assim, a avaliação do perfil, diversidade e abundância dos micro-organismos diazotróficos e amônio oxidantes em solos sob pastagem consorciada com leguminosas e a correlação entre as características dessas comunidades microbianas e as propriedades químicas do solo permitem compreender o efeito desse sistema sobre a microbiota que realiza papéis fundamentais no agroecossistema, possibilitando julgar sua eficácia na melhoria da qualidade biológica do solo, que reflete sobre a pastagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo e Amostragem

A área de estudo está situada na Estação Experimental do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), em Itambé, PE (07° 25', 35° 06' W, 190 m de altitude) (Figura 1). O clima é quente e úmido, classificado com AS' pela classificação de Köppen, com precipitação pluvial média de 1.200 mm ano⁻¹, temperatura média anual de 24°C e umidade relativa do ar de 80%, com maior ocorrência de chuvas de abril a julho (IPA, 1994; CPRH, 2003). Os solos predominantes na área são classificados como Argissolo Vermelho-Amarelo Tb distrófico úmbrico (JACOMINE et al., 1973; EMBRAPA, 2006).

O experimento, instalado em 2011, é composto por nove parcelas de 1 ha com leguminosas arbóreas, Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e Gliricídia (*Gliricidia sepium*), além da Braquiária solteira (*Brachiaria decumbens*) sem adubação nitrogenada. O plantio das leguminosas foi realizado em fileiras duplas, com espaçamento de 15 m x 1 m x 0,5 m, com a presença de braquiária entre as faixas de leguminosas. O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com três tratamentos, dois consórcios de gramínea + leguminosa: Braquiária + Sabiá (B+S) e Braquiária + Gliricídia (B+G), e um mantendo a braquiária solteira (B), com três repetições.

A área experimental, nos tratamentos contendo consórcio gramínea + leguminosa, foi dividida em três transectos (Figura 2), no sentido do maior comprimento, ao longo do qual foram marcados pontos entre as fileiras simples de leguminosas na fileira dupla (0 m), a quatro metros de distância das fileiras duplas (4 m) e a oito metros de distância das fileiras duplas (8 m) (Figura 3) para obtenção de amostras compostas na profundidade de 0,20 m. Nas parcelas com o cultivo de braquiária solteira, três amostras simples foram coletadas aleatoriamente para a composição de uma única amostra composta na mesma profundidade.

Os equipamentos usados foram lavados entre as coletas em cada ponto. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidas em ambiente resfriado e, posteriormente, congeladas a -20°C. As coletas foram realizadas em novembro de 2015 (estação seca) e junho de 2016 (estação chuvosa), onde as precipitações pluviais acumuladas em cada mês foram de 3,5 mm e 52,5 mm, respectivamente.

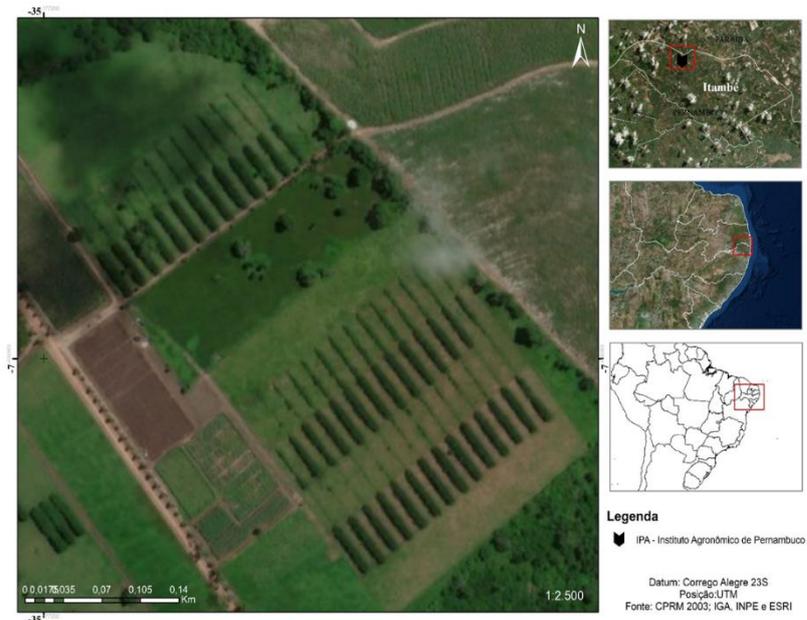


Figura 1. Localização da área de estudo e imagens aéreas do campo experimental

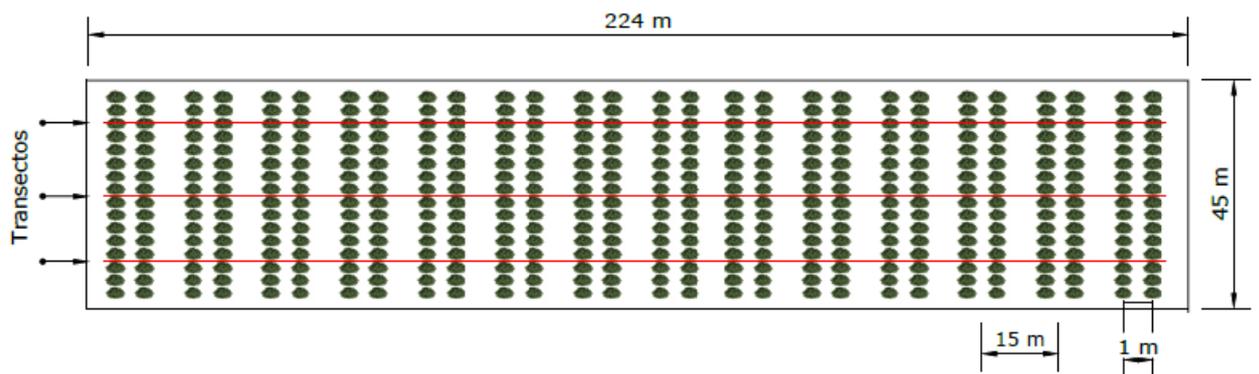


Figura 2. Representação da parcela experimental e distribuição dos transectos para coleta de solo em pastagem consorciada com leguminosas em Pernambuco

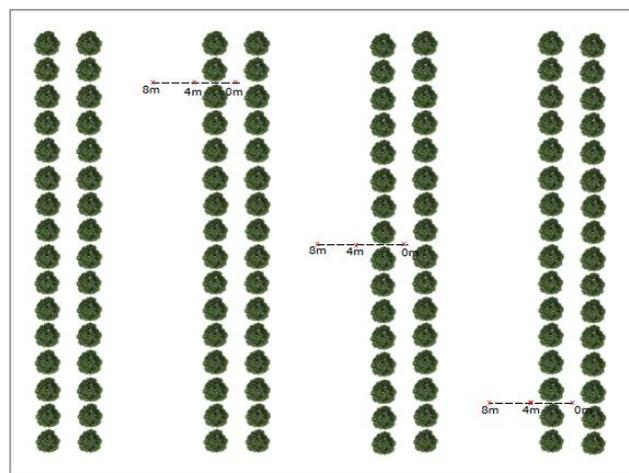


Figura 3. Detalhe dos pontos de coleta de solos nos transectos ao longo de uma parcela experimental com consórcio gramínea + leguminosa

3.2 Análise dos atributos físicos e químicos do solo

Para determinação dos atributos físicos e químicos do solo, as amostras foram secas ao ar, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. A caracterização física deteve-se a análise granulométrica, utilizando o método do densímetro (ALMEIDA et al., 2012) (Tabela 1). Nas análises químicas determinou-se o pH em água (1:2,5), Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+ , Al^{+3} , H+Al, P, carbono orgânico (CO), NH_4^+ , NO_3^- , Fe e Mo (Tabela 2 e 3).

O Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , NH_4^+ e NO_3^- foram extraídos por KCl a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; o K^+ , Na^+ , P, Fe e Mo por Mehlich-1; o H+Al por acetato de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ajustado a pH 7. O Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, o K^+ e o Na^+ foram determinados por fotometria de chama, o P por colorimetria e o Al^{3+} e (H+Al) por titulometria. O CO foi determinado por oxidação via úmida com dicromato de potássio. NH_4^+ e NO_3^- foram determinados por destilação por arraste de vapores (EMBRAPA, 2009). O Mo foi dosado por colorimetria como descrito por Fontes et al. (2000).

3.3 Extração de DNA do solo

O DNA foi extraído a partir de 0,4 g de solo, utilizando o Kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN Laboratories, Carlsbad, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA obtido foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1 % a 100 V por 30 min, em tampão TBE 0,5x (Tris, Borato, EDTA) adicionado ao corante Sybr® Gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands).

3.4 Análise de amplicons em eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

Nas análises de PCR-DGGE foram utilizadas as amostras coletadas a zero metros das leguminosas nos tratamentos com consórcio e as amostras coletadas na pastagem solteira, na estação úmida, para avaliar o efeito da introdução das leguminosas; enquanto para avaliar o efeito do sistema silvipastoril como um todo foram utilizadas as amostras coletadas a zero (0 m), quatro (4 m) e oito metros (8 m) a partir das leguminosas e as amostras coletadas na pastagem solteira, nas duas estações climáticas distintas.

Para bactéria total foi utilizado o fragmento do gene 16S rRNA como marcador molecular, amplificado usando os primers 341f-GC e 518R (MUYZER et al., 1993). Para a análise de bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos (*nifH*) foi utilizado nested PCR. As comunidades de bactérias amônio oxidantes (AOB) foram acessadas por meio de uma região específica do gene 16S rRNA, exclusiva de AOB pertencentes a subdivisão β proteobactérias, amplificada com os primers CTO189fA/CTO189fB, CTO189fC e CTO 654r. Os amplicons resultantes foram utilizados como molde na segunda reação de PCR com os primers 341f-GC e 518R. As reações foram feitas conforme descrito por Kowalchuk et al. (1997). Para a amplificação do gene *nifH* foram utilizados os primers FGPH19 e PolR na amplificação inicial, realizando-se a segunda reação com os primers POLF-GC e AQER. As condições e concentrações das reações foram feitas conforme descrito por Simonet et al. (1991) e Poly, Monrozier e Bally (2001).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, os amplicons foram analisados por DGGE utilizando-se um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad). Para a análise, foram preparados géis de poliacrilamida 8% (w/v), com gradiente desnaturante de 15 a 55% para 16S rRNA (bactéria total) e 16S rRNA (AOB). Para *nifH* utilizou-se o gradiente de 20 a 70% na avaliação do efeito da introdução das leguminosas e 20 a 55% na avaliação do sistema silvipastoril como um todo. 100% de desnaturação consistiu na concentração de 7M de ureia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos à eletroforese por 3 horas a 200 Volts com temperatura de 60°C. Após eletroforese, os géis foram corados com SYBR-Gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) em TAE (Tris, Acetato, EDTA) 0,5 x no escuro por 40 minutos e fotografados sob luz ultravioleta usando um transiluminador UV E-BOX VX2.

Os géis foram analisados utilizando o programa GelAnalyzer 2010. A similaridade entre as estruturas de comunidades de bactérias totais, bactérias fixadoras de nitrogênio e amônio oxidantes foi determinada com base na presença ou ausência de amplicons detectados após DGGE. As matrizes foram geradas utilizando o índice de similaridade de Bray-Curtis e as análises de agrupamento foram feitas usando a média dos grupos com o programa 'Primer 6' (Phymouth Marine, Primer, Reino Unido) e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de similaridade (ANOSIM).

A diversidade, dominância e equitabilidade das comunidades de bactérias totais, bactérias amônio oxidantes e diazotróficos foi avaliada pelos índices de diversidade de Shannon (S), índice de dominância de Simpson (D) e índice equitabilidade de Pielou (E). Para isso foram utilizados o número de bandas presentes nas faixas do gel e os perfis de intensidade de bandas, onde a intensidade foi considerada como a altura dos picos no perfil. Os índices H' , D e E foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$H' = - \sum_{i=1}^{i=S} p_i \ln p_i \qquad D = \sum_{i=1}^{i=S} p_i^2 \qquad E = \frac{H'}{\ln S}$$

onde S (riqueza de amplicons) é o número de bandas no perfil, $p_i = n_i/N$; n_i é a altura do pico e N é a soma de todas as alturas dos picos no perfil.

3.5 Quantificação de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos por PCR em tempo real (qPCR)

A abundância de bactérias totais, AOB e diazotróficos foi quantificada por qPCR, utilizando como genes alvo o 16S rRNA (bactéria total e AOB) e o gene *nifH*, respectivamente. Os primers e as condições das reações são apresentadas na Tabela 1. Um controle negativo foi adicionado em todas as quantificações visando o monitoramento de contaminações.

As reações foram realizadas em triplicatas, no volume final de 10 μ L contendo 5 μ L do kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 10 μ M de primers e 1 μ L de DNA, usando o LightCycler® 480 (Roche Applied Science). As curvas padrões foram obtidas utilizando diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) de amostras de DNA metagenômico com concentração conhecida. Todas as reações de amplificação apresentaram valores de eficiência entre 98 e 100%, e os valores de R^2 das curvas padrão foram sempre maiores que 0,98.

3.6 Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram inicialmente avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade, sendo transformados em logaritmo quando necessário. Em seguida, foram analisados utilizando contraste ortogonal, onde foram realizadas as seguintes comparações: tratamentos com braquiária solteira contra os com o consórcio gramínea + leguminosa (B+L x B), braquiária solteira contra a faixa de leguminosas (B x B+L 0m) e entre as estações climáticas independente do manejo (Úmida x Seca); ao nível de significância de 5 % pelo teste de t. Após a análise, os tratamentos com consórcio gramínea + leguminosa foram analisados separadamente, onde os resultados foram submetidos a análise de variância, em arranjo fatorial 2x3x2 (duas espécies leguminosas x três distâncias x duas estações), utilizando o Mixed Procedure do SAS, onde os melhores modelos foram selecionados com base no menor AIC (Critério de Informação de Akaike). Para testar as diferenças estatisticamente significativas foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de componentes principais (PCA) foi baseada nos dados de qPCR, DGGE e atributos químicos do solo, e teve como finalidade observar os agrupamentos dos tratamentos e sua associação com os atributos do solo (LEPŠ; ŠMILAUER 2003). O programa CANOCO versão 4.5 foi utilizado para a realização da PCA (Biometris, The Netherlands).

Os coeficientes de correlação de Spearman (ρ) foram calculados utilizando o CORR Procedure do SAS para determinar associações significativas entre variáveis discriminantes.

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem usados para amplificar os genes alvo

Primers PCR-DGGE	Sequências (5'-3')	Condições de ciclagem térmica
Bactéria total (16S rRNA)		
	CGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG	95°C 10 min, 1 ciclo; 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 3 min, 30 ciclos; 72°C 10 min, 1 ciclo
341f-GC ¹	ATTACCGCGGCTGCTGG	
518r ¹		
AOB (16S rRNA)		
CTO189fA/CTO189fB CTO189fC ² R1 ³	GGAGRAAAGCAGGGGATCG GGAGGAAAGTAGGGGATCG CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	95°C 3 min, 1 ciclo; 95°C 30 s, 57°C 1 min, 68°C 45 s, 35 ciclos; 68°C 5 min, 1 ciclo
Diazotróficos (<i>nifH</i>)		
FGPH19 ⁴ PoIR ⁵	TACGGCAARGGTGGNATH ATSGCCATCATYTCRCCG	95°C 5 min, 1 ciclo; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 30 ciclos; 72°C 10 min, 1 ciclo
PoIF-GC ⁵	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCG CCCCGCCCCTCCGAYCCSAARGCBGACTC	94°C 5 min, 1 ciclo; 95°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2 min, 30 ciclos; 72°C 10 min, 1 ciclo
AQER ⁵	ACTATGTAGATYTCCTG	
Primers qPCR		
Bactéria total (16S rRNA)		
	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C 5 min, 1 ciclo; 95°C 10 s, 60°C 10 s, 72°C 30 s, 40 ciclos
341f ¹	ATTACCGCGGCTGCTGG	
518r ¹		
AOB (16S rRNA)		
CTO189fA/CTO189fB CTO189fC ² R1 ³	GGAGRAAAGCAGGGGATCG GGAGGAAAGTAGGGGATCG CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	95°C 3 min, 1 ciclo; 95°C 30 s, 58°C 1 min, 68°C 45 s, 35 ciclos; 68°C 5 min, 1 ciclo
Diazotróficos (<i>nifH</i>)		
FGPH19 ⁴ PoIR ⁵	TACGGCAARGGTGGNATH ATSGCCATCATYTCRCCG	95°C 5 min, 1 ciclo; 94°C 1 min, 57°C 45 s, 72°C 1 min, 30 ciclos; 72°C 7 min, 1 ciclo

¹Muyzer et al. (1993); ²Kowalchuk et al. (1997); ³Hermansson and Lindgren (2001); ⁴Simonet et al. (1991); ⁵Poly, Monrozier e Bally (2001)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atributos físicos e químicos do solo

Os solos da área experimental apresentaram textura Franco-argiloarenosa em todos os tratamentos, com teores de areia variando de 49,6 a 66,0%, silte variando de 13,2 a 18,7% e argila variando de 17,4 a 33,2% (Tabela 2).

Tabela 2. Atributos físicos dos solos sob sistema silvipastoril

Atributos físicos	Tratamentos		
	Braquiária	Braquiária+Gliricídia	Braquiária+Sabiá
Areia (g kg ⁻¹) ¹	575 ± 25	524 ± 8	549 ± 4
Silte (g kg ⁻¹) ¹	165 ± 5	155 ± 10	140 ± 1
Argila (g kg ⁻¹) ¹	259 ± 26	321 ± 3	311 ± 4
Classe textural	Franco-argiloarenosa		

Médias seguidas pelo valor do erro padrão; n = 3.

Os solos apresentaram valores de pH e H+Al significativamente diferentes entre os tratamentos, onde as amostras sob os tratamentos com consórcio gramínea + leguminosa (B+L) mostraram pH mais baixo e maior acidez potencial (Tabelas 3 e 4). Observou-se CTC significativamente maior nos solos sob B+L. Também foi observado diferenças significativas no teor de nitrato (N-NO₃⁻) entre os solos sob a faixa de leguminosas (B+L 0 m) e os solos sob pastagem solteira (B). A tabela 5 apresenta os contrastes e as comparações (teste de t) entre os atributos químicos que mostraram efeito significativo.

Tabela 3. Atributos químicos dos solos sob sistema silvipastoril na estação seca

Atributos químicos	Tratamentos		
	Braquiária	Braquiária +Glicíδια	Braquiária+Sabiá
pH (H ₂ O)	5,41 ± 0,05	5,18 ± 0,04	4,98 ± 0,03
P (mg kg ⁻¹)	14,76 ± 2,61	14,75 ± 2,27	13,93 ± 1,28
N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	37,35 ± 7,13	23,35 ± 2,75	21,01 ± 1,44
N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	5,45 ± 0,45	15,82 ± 0,91	23,99 ± 8,15
CO (g kg ⁻¹)	39,90 ± 0,12	43,33 ± 1,90	44,94 ± 1,01
Fe (mg kg ⁻¹)	31,74 ± 4,89	31,46 ± 4,62	34,92 ± 4,76
Mo (mg kg ⁻¹)	0,24 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Ca ²⁺ (cmolc kg ⁻¹)	3,58 ± 0,18	4,36 ± 0,43	3,95 ± 0,15
Mg ²⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,71 ± 0,08	0,84 ± 0,02	0,68 ± 0,07
K ⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,28 ± 0,06	0,33 ± 0,01	0,25 ± 0,02
Na ⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Al ³⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,22 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,31 ± 0,06
H + Al (cmolc kg ⁻¹)	4,98 ± 0,19	5,68 ± 0,23	6,22 ± 0,29
SB (cmolc kg ⁻¹)	4,61 ± 0,29	5,58 ± 0,44	4,93 ± 0,18
T (cmolc kg ⁻¹)	9,60 ± 0,23	11,27 ± 0,33	11,15 ± 0,35
t (cmolc kg ⁻¹)	4,83 ± 0,27	5,89 ± 0,39	5,24 ± 0,15
V (%)	47,93 ± 2,30	48,72 ± 2,87	44,42 ± 1,49
m (%)	4,75 ± 0,81	6,15 ± 1,64	6,16 ± 1,30

Médias seguidas pelo valor do erro padrão; n = 3. Média das distâncias 0, 4 e 8 metros em Braquiária+Glicíδια e Braquiária+Sabiá. CO: Carbono orgânico total; SB: Soma de bases; T: CTC potencial; t: CTC efetiva; V: Saturação por bases; m: Saturação por alumínio

Tabela 4. Atributos químicos dos solos sob sistema silvipastoril na estação úmida

Atributos químicos	Tratamentos		
	Braquiária	Braquiária+Gliricídia	Braquiária+Sabiá
pH (H ₂ O)	5,74 ± 0,02	5,55 ± 0,05	5,33 ± 0,02
P (mg kg ⁻¹)	13,35 ± 1,47	12,76 ± 1,85	11,83 ± 0,30
N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	38,91 ± 2,38	23,86 ± 1,50	24,90 ± 1,87
N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	4,67 ± 0,58	4,80 ± 0,40	5,45 ± 0,59
CO (g kg ⁻¹)	29,91 ± 2,09	30,70 ± 0,57	30,88 ± 1,32
Fe (mg kg ⁻¹)	37,22 ± 5,66	32,86 ± 2,01	36,88 ± 2,84
Mo (mg kg ⁻¹)	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01
Ca ²⁺ (cmolc kg ⁻¹)	2,84 ± 0,15	3,59 ± 0,19	3,02 ± 0,01
Mg ²⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,55 ± 0,06	0,57 ± 0,03	0,58 ± 0,01
K ⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,32 ± 0,05	0,27 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Na ⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Al ³⁺ (cmolc kg ⁻¹)	0,20 ± 0,00	0,29 ± 0,05	0,54 ± 0,06
H + Al (cmolc kg ⁻¹)	5,58 ± 0,25	5,91 ± 0,20	6,82 ± 0,29
SB (cmolc kg ⁻¹)	3,75 ± 0,23	4,49 ± 0,21	3,73 ± 0,02
T (cmolc kg ⁻¹)	9,34 ± 0,49	10,40 ± 0,14	10,54 ± 0,28
t (cmolc kg ⁻¹)	3,95 ± 0,23	4,78 ± 0,17	4,27 ± 0,06
V (%)	40,06 ± 0,52	43,16 ± 1,85	35,46 ± 1,03
m (%)	5,18 ± 0,34	6,43 ± 1,23	12,68 ± 1,24

Médias seguidas pelo valor do erro padrão; n = 3. Média das distâncias 0, 4 e 8 metros em Braquiária+Gliricídia e Braquiária+Sabiá. CO: Carbono orgânico total; SB: Soma de bases; T: CTC potencial; t: CTC efetiva; V: Saturação por bases; m: Saturação por alumínio

Tabela 5. Contrastes ortogonais e comparações entre os manejos e as diferentes estações climáticas (Seca e Úmida) para os atributos químicos do solo

Contraste	CO	N-NO ₃ ⁻	pH	H+Al	SB	CTC	Mo
t Value							
B+L x B	0,98 ^{ns}	1,11 ^{ns}	-3,85 ^{**}	2,19 [*]	1,38 ^{ns}	3,03 [*]	-0,98 ^{ns}
B x B+L 0 m	0,93 ^{ns}	-2,74 [*]	3,52 ^{**}	-1,87 ^{ns}	-1,92 ^{ns}	-1,94 ^{ns}	1,30 ^{ns}
Úmida x Seca	-6,85 ^{**}	-6,42 ^{**}	5,95 ^{**}	2,59 [*]	-4,30 ^{**}	-3,13 ^{**}	-8,85 ^{**}

B+L: consórcio gramínea + leguminosa (média das distâncias); B+L 0 m: faixa de leguminosas, B: braquiária solteira. ^{*}significativo a 5%; ^{**}significativo a 1%; ^{ns} não significativo pelo teste de t

A maior acidez do solo sob Gliricídia e Sabiá, quando comparada à Braquiária, também foi reportada por Silva et al. (2013), que atribuíram esta acidez a maior liberação de H⁺ pelas leguminosas para o balanceamento de cargas entre o solo e a raiz, devido a maior absorção de cátions. Uma vez que o processo de nitrificação gera H⁺ para o solo (HEIL; VERECKEN; BRÜGGEMANN, 2015), a diferença no pH entre B+L e B (e B+L 0m e B) também pode ser atribuída a menor atividade de nitrificadores nos solos sob Braquiária (BOWATTE et al., 2011), o que corrobora os maiores teores de N-NH₄⁺, menores teores de N-NO₃⁻ e a menor abundância de AOB em B (Figura 7) e nos pontos mais distantes das leguminosas (Figura 9a).

O efeito significativo da estação climática sobre os atributos químicos é atribuído ao maior volume e intensidade de chuvas na estação úmida, já que a água da chuva transporta os elementos químicos e compostos orgânicos para horizontes mais profundos do solo (MENDES et al., 2015; ROSOLEM; CALONEGO; FOLONI, 2003; SPARLING et al., 2016), resultando em maior teor de CO, N-NO₃⁻, SB e Mo na estação seca.

4.2 Efeito da introdução de leguminosas arbóreas sobre a estrutura das comunidades microbianas

O agrupamento hierárquico para bactérias totais e AOB formou dois grupos distintos: um agrupando amostras dos tratamentos com consórcio gramínea + leguminosa e outro com amostras de B (Figura 4a e 4b). Na análise das comunidades de diazotróficos não houve a formação de grupos bem definidos entre os tratamentos (Figura 4c).

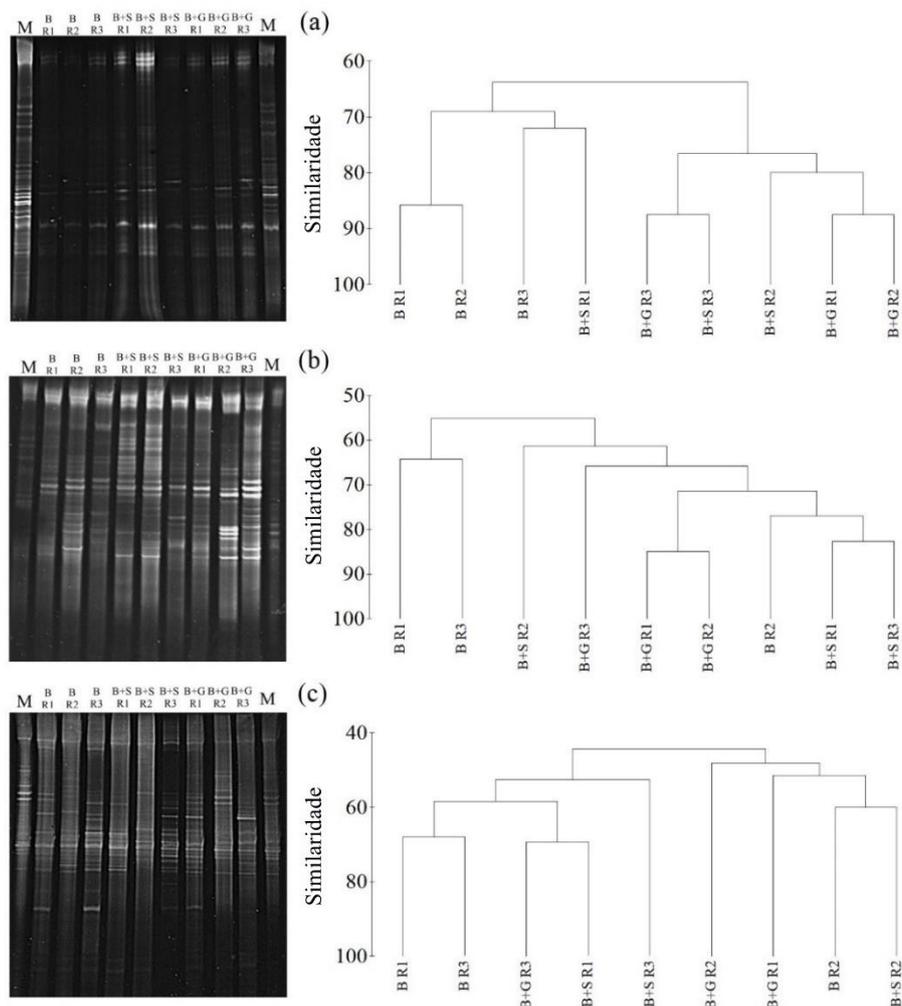


Figura 4. Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) a zero metros das leguminosas em solos sob sistema silvipastoril. B: Braquiária; B+S: Braquiária + Sabiá; B+G: Braquiária + Gliricídia, R: repetições; M: marcador

A ANOSIM comprovou que a estrutura das comunidades de bactérias totais e AOB é claramente distinta (R Statistic > 0,5) entre o solo sob leguminosas e o solo sob a braquiária cultivada de forma solteira (Tabela 6). Essa diferença pode estar relacionada à modificação dos atributos químicos do solo pelas leguminosas, principalmente àqueles relacionados à acidez (JESUS et al., 2009), como demonstrado por Jeanbille et al. (2015) e Nicol et al. (2008), que observaram correlação entre mudanças na estrutura das comunidades de bactérias totais e AOB e o pH (e atributos químicos relacionados) do solo. Devido à maioria dos táxons bacterianos apresentarem tolerância ao pH relativamente estreita para o crescimento, a acidez do solo influencia diretamente a estrutura e abundância das comunidades (ROUSK et al., 2010).

Tabela 6. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) dos genes 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene *nifH* de diazotróficos a zero metros das leguminosas em solos sob sistema silvipastoril

Tratamentos	<i>Bacteria</i>	<i>AOB</i>	<i>nifH</i>
	<i>R Statistic</i>		
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,81*	0,61*	0,24 ^{ns}
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,79*	0,48*	0,14 ^{ns}
Braquiária + Gliricidia x Braquiária + Sabiá	0,07 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,03 ^{ns}

*significativo a 10%; ^{ns} não significativo. R > 0,75: grupos bem separados; R > 0,5: grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados; R < 0,25: grupos pouco separados

A ausência de diferenças significativas nas comunidades de diazotróficos entre B+G e B e B+S e B é atribuída a utilização do gradiente desnaturante de 20 a 70%, o qual não se mostrou adequado à migração dos amplicons do gene *nifH*, uma vez que a utilização do gradiente de 20 a 55% permitiu observar diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 7 e 8). Muyzer e Smalla (1998) realçam a importância da otimização do gradiente desnaturante para a obtenção de melhor separação de diferentes fragmentos de DNA na técnica de DGGE.

Não foi observada diferença significativa entre a introdução de Gliricídia e Sabiá sobre a estrutura das comunidades avaliadas, apesar das espécies pertencerem a subfamílias distintas (Papilionoideae e Mimosoideae, respectivamente) e de haver registros da sua associação com diferentes bactérias (ACOSTA-DURÁN; MARTÍNEZ-ROMERO, 2002; COELHO et al., 2018; MARTINS et al., 2015).

4.3 Efeito do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas sobre a estrutura e diversidade das comunidades microbianas

4.3.1 Estrutura das comunidades microbianas

Na estação seca, as análises de agrupamento hierárquico para todos os grupos de micro-organismos avaliados apresentaram conjuntos bem definidos entre os tratamentos, separando as amostras coletadas a zero metros das amostras coletadas a oito metros.

Na análise de bactéria total, Braquiária+Gliricídia coletada a quatro metros (B+G4m) tendeu a se agrupar com Braquiária+Gliricídia coletada a oito metros

(B+G8m), enquanto Braquiária+Sabiá coletada a quatro metros (B+S4m) agrupou-se melhor com Braquiária+Sabiá coletada a zero metros (B+S0m). Surpreendentemente, as amostras de Braquiária solteira (B) agruparam-se com B+S0m (Figura 5a).

Para AOB, B+G4m não apresentou um padrão de agrupamento, mostrando-se disperso entre os grupos formados por Braquiária+Gliricídia coletada a zero metros (B+G0m) e B+G8m; enquanto em B+S as amostras coletadas a quatro metros seguiram a mesma tendência das comunidades de bactéria total, com B+S4m agrupando-se com B+S0m. As amostras de B agruparam-se com uma repetição de B+G0m (Figura 5b).

Na análise de diazotróficos, assim como bactéria total, B+G4m agrupou-se com B+G8m, enquanto B+S4m tendeu a se agrupar com B+S0m. As amostras de B agruparam-se entre si (Figura 5c).

Os resultados do teste de pareamento da ANOSIM para bactéria total entre os manejos mostraram diferença significativa apenas entre B+G8m e B, apresentando R Statistic igual a 0,80 ($p < 0,05$), indicando comunidades bacterianas distintas. Para AOB, observou-se diferenças significativas entre B+S(0m e 8m) e B (R Statistic = 0,64 e 0,74, respectivamente; $p < 0,05$), apresentando comunidades claramente diferenciadas. Já para *nifH*, observou-se comunidades claramente diferenciadas entre B+G(0m e 4m) e B (R Statistic = 0,60 e 0,61, respectivamente; $p < 0,05$) (Tabela 7).

Os resultados da análise entre as distâncias apresentaram diferenças significativas entre todos os pontos, para todos os grupos microbianos avaliados, com pouca dissimilaridade entre 0 e 4 metros e entre 4 e 8 metros, enquanto os pontos 0 e 8 metros se mostraram claramente diferenciados.

Esses resultados mostram que o efeito do sistema silvipastoril sobre as comunidades de bactéria total e AOB não se limita a faixa de influência do sistema radicular e copa das leguminosas, uma vez que os mesmos não chegam a oito metros de distância a partir do caule (FONTE et al., 2013; CARVALHO, 2007; OZIER-LAFONTAINE; LECOMPTE; SILLON, 1999). A diferença na estrutura das comunidades de bactéria total e AOB entre o consórcio gramínea + leguminosa a oito metros e o manejo da braquiária solteira pode estar relacionada a redução do pastejo nos pontos mais afastados das leguminosas no manejo consorciado (PATRA et al., 2005; ROUX et al., 2008), uma vez que o gado tende a se reunir e se alimentar nas áreas próximas à sombra (VENDRAMINI et al., 2014).

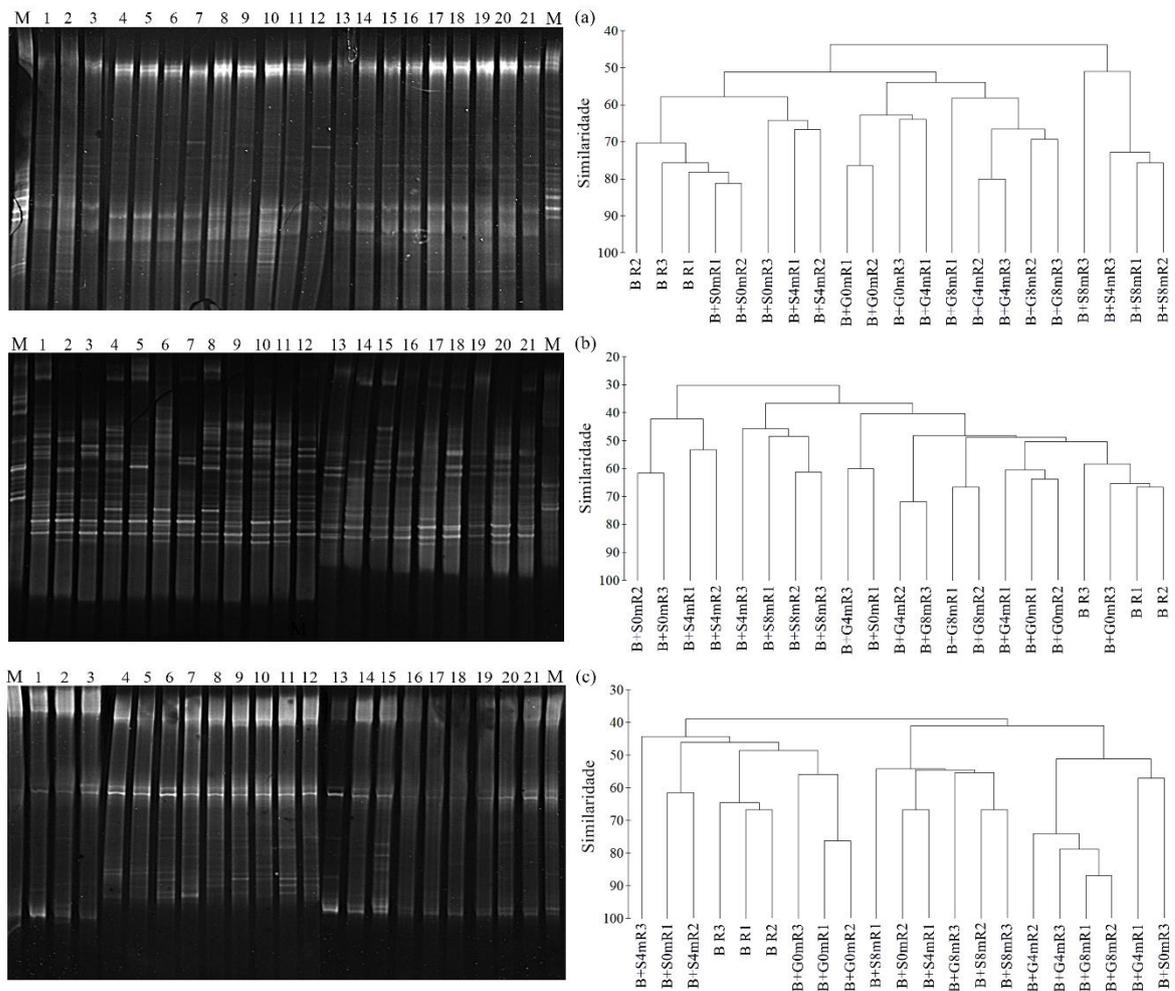


Figura 5. Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril na estação seca. B: Braquiária: 1, 2, 3; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros: 4, 5, 6; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros: 7, 8, 9; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros: 10, 11, 12; B+S0m: Braquiária + Sabiá a zero metros: 13, 14, 15; B+S4m: Braquiária + Sabiá a quatro metros: 16, 17, 18; B+S8m: Braquiária + Sabiá a oito metros: 19, 20, 21; R: repetições; M: marcador

A diferença na estrutura das comunidades de diazotróficos entre B+G(0m e 4m) e B, e entre os pontos 0 m e 8 m em ambos os consórcios, é atribuída a associação das leguminosas à bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas (rizóbios) (FLORENTINO et al., 2014; SANTOS, 2017), enquanto a oito metros há a predominância de bactérias de vida livre e associativas na pastagem (MOREIRA et al., 2010; GUPTA et al., 2014).

Tabela 7. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene *nifH* de diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação seca

Bactéria total (16S rRNA)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,35 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,32 ^{ns}
Braquiária x Braquiária + Sabiá	-0,04 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,80 ^{**}
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	0,26 [*]		
0 metros x 8 metros	0,63 ^{**}		
4 metros x 8 metros	0,25 ^{**}		
AOB (16S rRNA)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	-0,03 ^{ns}	0,33 [*]	0,20 ^{ns}
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,64 ^{**}	0,11 ^{ns}	0,74 ^{**}
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	0,36 [*]		
0 metros x 8 metros	0,61 ^{**}		
4 metros x 8 metros	0,39 [*]		
Diazotróficos (<i>nifH</i>)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,60 ^{**}	0,61 ^{**}	0,49 [*]
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,24 ^{ns}	0,39 [*]	0,45 ^{**}
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	0,50 ^{**}		
0 metros x 8 metros	0,64 ^{**}		
4 metros x 8 metros	0,21 ^{ns}		

*significativo a 10%; **significativo a 5%; ^{ns} não significativo. R > 0,75: grupos bem separados; R > 0,5: grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados; R < 0,25: grupos pouco separados

Na estação úmida, as análises de agrupamento hierárquico de todos os grupos de micro-organismos avaliados tornaram ainda mais visíveis os agrupamentos formados entre os tratamentos, mostrando novamente a tendência de separação entre os grupos formados pelas amostras coletadas a zero metros dos grupos formados pelas amostras coletadas a oito metros, com as amostras coletadas a quatro metros comportando-se como intermediárias entre os dois extremos (0 e 8 m). As amostras de B agruparam-se entre si (Figura 6).

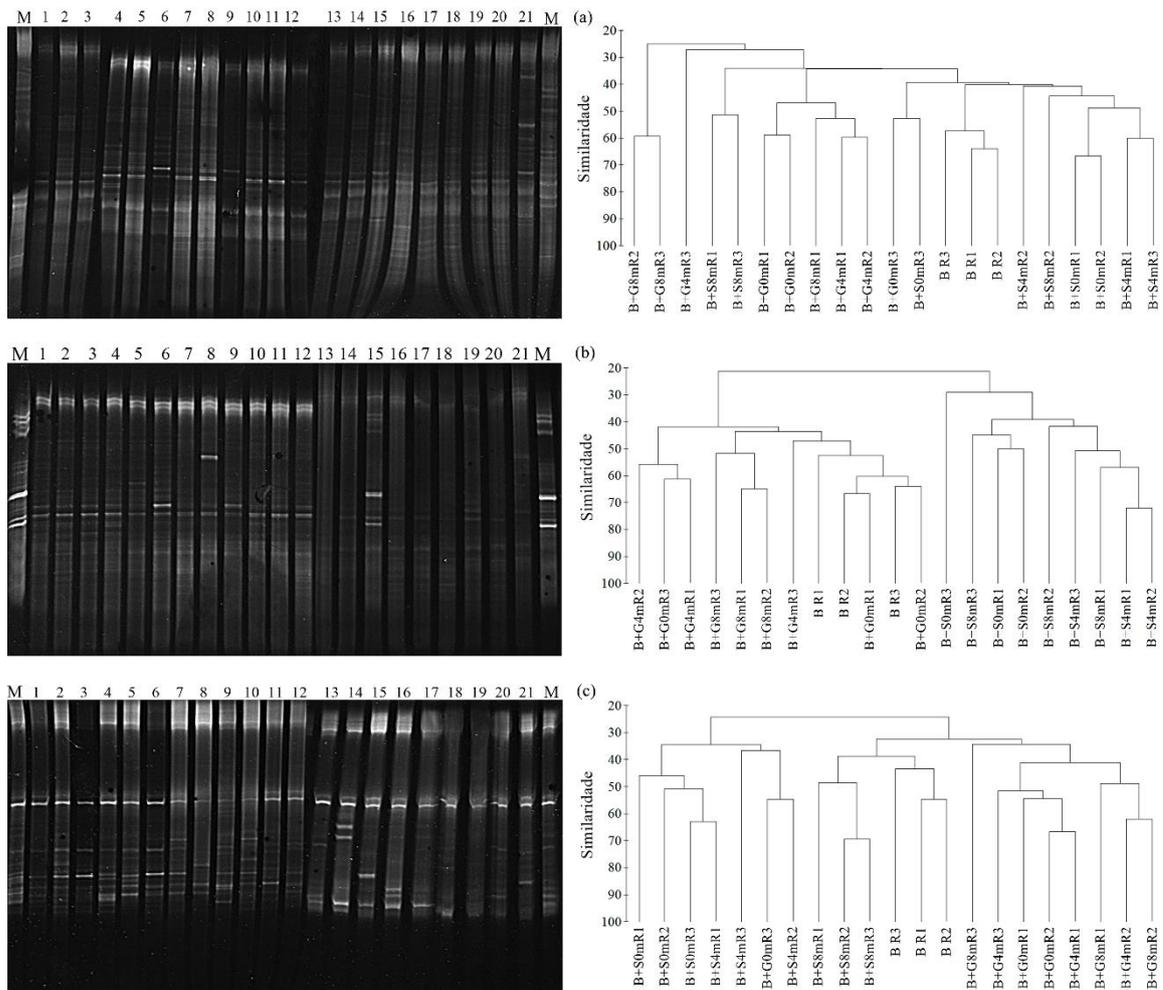


Figura 6. Perfil de amplicons e agrupamento hierárquico do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida. B: Braquiária: 1, 2, 3; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros: 4, 5, 6; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros: 7, 8, 9; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros: 10, 11, 12; B+S0m: Braquiária + Sabiá a zero metros: 13, 14, 15; B+S4m: Braquiária + Sabiá a quatro metros: 16, 17, 18; B+S8m: Braquiária + Sabiá a oito metros: 19, 20, 21; R: repetições; M: marcador

Em todos os grupos de micro-organismos avaliados as amostras coletadas a quatro metros (B+G4m e B+S4m) tenderam a se agrupar com as amostras coletadas a zero metros (B+G0m e B+S0m), exceto em AOB no consórcio Braquiária + Sabiá, onde B+S4m agrupou-se a B+S8m. Isto evidencia o aumento do raio de influência das leguminosas sobre as comunidades de bactérias totais e diazotróficos na estação úmida, explicado pelo maior desenvolvimento de folhas e ramos das leguminosas nessa estação (APOLINÁRIO et al., 2015), podendo ultrapassar quatro metros a partir do fuste. Além disso, o suprimento hídrico durante estação úmida pode ter

intensificado a atividade radicular das plantas, promovendo condição favorável ao estabelecimento da simbiose leguminosa-rizóbio (PEOPLES et al., 2012).

Os resultados do teste de pareamento da ANOSIM para bactéria total entre os manejos mostraram diferenças significativas entre B e B+G em todas as distâncias avaliadas, apresentando valores de R Statistic superiores a 0,75, indicando comunidades bacterianas distintas. Também foram observadas comunidades bacterianas distintas entre B+S(4 m e 8 m) e B (R Statistic = 0,61 e 0,85, respectivamente; $p < 0,05$). Para AOB, foram observadas diferenças significativas entre B+S(4 m e 8 m) e B, com comunidades distintas entre B+S4m e B. Para *nifH*, observou-se comunidades claramente diferenciadas entre B+G(0 m e 4m) e B (R Statistic = 0,62 e 0,61, respectivamente; $p < 0,05$) e entre B+S(0 m e 4 m) e B (R Statistic = 0,81 e 0,79, respectivamente; $p < 0,05$).

Os resultados da análise entre as distâncias para bactéria total e AOB apresentaram diferenças significativas entre todos os pontos, com pouca dissimilaridade entre os pontos em AOB, enquanto bactéria total apresentou grupos claramente diferenciados entre 0 e 8 metros. As comunidades de diazotróficos, por sua vez, apresentaram diferenças significativas entre 0 e 8 metros e entre 4 e 8 metros, com comunidades claramente diferenciadas entre os pontos (Tabela 8).

Cubillos et al. (2016) também observaram diferenças significativas nas estruturas das comunidades de bactérias totais e AOB entre solos sob sistema silvipastoril com leguminosas (*Prosopis juliflora*) e pastagens em cultivo solteiro. As comunidades bacterianas são estimuladas pela maior atividade enzimática e maior concentração de C e N abaixo do dossel das árvores, formando “ilhas de comunidades microbianas” (CUBILOS et al., 2016). Como a maior parte das bactérias do solo são heterotróficas, mudanças na quantidade e qualidade de substrato disponível no solo alteram a estrutura de suas comunidades, havendo o favorecimento de bactérias copiotróficas em solos com altos teores de nutrientes, enquanto bactérias oligotróficas são desfavorecidas (LEFF et al., 2015).

A estimulação dos diazotróficos pelas leguminosas ocorre pela ação de uma série de compostos orgânicos (flavonoides, betaínas, ácido jasmônico, entre outros) que se acumulam nas extremidades das raízes e são secretados pela zona capilar, sendo essenciais na interação planta-micro-organismo (CERRO et al., 2015; LIRA JR; NASCIMENTO; FRACETTO, 2015), motivo provável pelo qual não observamos

diferença na estrutura das comunidades de diazotróficos entre os pontos mais distantes das leguminosas e a braquiária solteira

Tabela 8. Valores de R Statistic do teste de pareamento da análise de similaridade baseados nos perfis da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA de bactéria total e bactérias amônio oxidantes (AOB), e do gene *nifH* de diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida

Bactéria total (16S rRNA)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,80**	0,77**	0,85**
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,44*	0,61**	0,85**
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	0,44**		
0 metros x 8 metros	0,64**		
4 metros x 8 metros	0,50**		
AOB (16S rRNA)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,17 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,09 ^{ns}
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,04 ^{ns}	0,51**	0,34**
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	0,38*		
0 metros x 8 metros	0,45*		
4 metros x 8 metros	0,27*		
Diazotróficas (<i>nifH</i>)			
	R Statistic		
Manejo	0 m	4 m	8 m
Braquiária x Braquiária + Gliricidia	0,62**	0,61**	0,14 ^{ns}
Braquiária x Braquiária + Sabiá	0,81**	0,79**	0,17 ^{ns}
Distância	R Statistic		
0 metros x 4 metros	-0,13 ^{ns}		
0 metros x 8 metros	0,61**		
4 metros x 8 metros	0,50*		

*significativo a 10%; **significativo a 5%; ^{ns} não significativo. R > 0,75: grupos bem separados; R > 0,5: grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados; R < 0,25: grupos pouco separados

4.3.2 Diversidade das comunidades microbianas

A dominância, diversidade e equitabilidade de bactérias totais, AOB e organismos diazotróficos foi estimada pelos índices de Simpson (*D*), Shannon (*H'*) e Pielou (*E*), com base nos resultados de DGGE (Tabelas 10 e 11).

Não foi observado efeito significativo do sistema silvipastoril sobre a dominância, diversidade e equitabilidade de bactérias totais. As AOB apresentaram

maior dominância sob B. As comunidades de diazotróficos mostraram maior diversidade e equitabilidade sob B+L (Tabela 9).

Tabela 9. Contrastes ortogonais e comparação entre os diferentes manejos e estações climáticas para Dominância (*D*), diversidade (*H'*) e equitabilidade (*E*) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos

Bactéria total (16S rRNA)			
Contraste	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
t Value			
B+L x B	-0,53 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,34 ^{ns}
B x B+L 0 m	-0,06 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,85 ^{ns}
Úmida x Seca	1,79 ^{ns}	-0,72 ^{ns}	-4,49 ^{**}
AOB (16S rRNA)			
Contraste	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
t Value			
B+L x B	-2,21 [*]	0,72 ^{ns}	0,17 ^{ns}
B x B+L 0 m	1,95 ^{ns}	-0,66 ^{ns}	-0,63 ^{ns}
Úmida x Seca	0,33 ^{ns}	-0,42 ^{ns}	2,81 [*]
Diazotróficos (<i>nifH</i>)			
Contraste	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
t Value			
B+L x B	-1,82 ^{ns}	2,51 [*]	2,77 [*]
B x B+L 0 m	1,67 ^{ns}	-2,21 [*]	-1,57 ^{ns}
Úmida x Seca	0,27 ^{ns}	1,24 ^{ns}	-3,00 ^{**}

B+L: consórcio gramínea + leguminosa (média das distâncias); B+L 0 m: faixa de leguminosas, B: braquiária solteira. *significativo a 5%; **significativo a 1%; ^{ns} não significativo pelo teste de t

A maior diversidade de diazotróficos e a menor dominância de AOB em B+L, quando comparado a B, reflete na maior redundância funcional de bactérias ligadas ao ciclo do N no solo, o que é essencial na manutenção do funcionamento do ecossistema (MENDES et al., 2015), evidenciando a eficácia do manejo do pasto consorciado com leguminosas na melhoria da qualidade do solo.

As comunidades de bactérias totais e diazotróficos apresentaram maior equitabilidade na estação seca, enquanto AOB apresentou maior equitabilidade na estação úmida. É possível que a condição de umidade do solo na estação seca

(umidade gravimétrica = 6,9%) não tenha sido crítica para as bactérias totais e diazotróficos, e que esses grupos microbianos tenham se beneficiado do maior teor de CO nesta estação. Sheik et al. (2015) também observaram maior equitabilidade de bactérias durante a seca e o calor em pastagens no Oklahoma (EUA). Nas condições de escassez de chuvas, o microbioma sobrevive às custas da reserva de umidade do solo (SHEIK et al., 2015).

Tabela 10. Valores dos índices de Dominância (*D*), diversidade (*H'*) e equitabilidade (*E*) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação seca

Bactéria total (16S rRNA)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,10 ± 0,01	2,57 ± 0,07	0,88 ± 0,01
Braquiária+Gliricídia	0,13 ± 0,01	2,45 ± 0,08	0,82 ± 0,01
Braquiária+Sabiá	0,11 ± 0,01	2,52 ± 0,05	0,89 ± 0,01
AOB (16S rRNA)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,14 ± 0,01	2,32 ± 0,05	0,78 ± 0,01
Braquiária+Gliricídia	0,13 ± 0,01	2,42 ± 0,05	0,78 ± 0,01
Braquiária+Sabiá	0,18 ± 0,01	2,10 ± 0,04	0,75 ± 0,02
Diazotróficos (<i>nifH</i>)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,32 ± 0,01	1,50 ± 0,04	0,70 ± 0,02
Braquiária+Gliricídia	0,21 ± 0,01	1,94 ± 0,05	0,76 ± 0,02
Braquiária+Sabiá	0,29 ± 0,03	1,73 ± 0,08	0,80 ± 0,02

Médias seguidas pelo valor do erro padrão; n = 3. Média das distâncias 0, 4 e 8 metros em Braquiária+Gliricídia e Braquiária+Sabiá

Tabela 11. Valores dos índices de Dominância (*D*), diversidade (*H'*) e equitabilidade (*E*) de bactéria total, bactérias amônio oxidantes (AOB) e diazotróficos em solos sob sistema silvipastoril na estação úmida

Bactéria total (16S rRNA)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,17 ± 0,01	2,19 ± 0,05	0,78 ± 0,01
Braquiária+Gliricídia	0,16 ± 0,01	2,36 ± 0,08	0,78 ± 0,01
Braquiária+Sabiá	0,10 ± 0,00	2,58 ± 0,04	0,87 ± 0,01
AOB (16S rRNA)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,21 ± 0,02	2,09 ± 0,02	0,81 ± 0,00
Braquiária+Gliricídia	0,13 ± 0,01	2,47 ± 0,05	0,78 ± 0,01
Braquiária+Sabiá	0,16 ± 0,01	2,04 ± 0,06	0,88 ± 0,01
Diazotróficos (<i>nifH</i>)			
	Dominância (<i>D</i>)	Diversidade (<i>H'</i>)	Equitabilidade (<i>E</i>)
Braquiária	0,33 ± 0,03	1,59 ± 0,08	0,61 ± 0,02
Braquiária+Gliricídia	0,17 ± 0,01	2,16 ± 0,06	0,75 ± 0,02
Braquiária+Sabiá	0,26 ± 0,02	1,75 ± 0,08	0,67 ± 0,02

Médias seguidas pelo valor do erro padrão; n = 3. Média das distâncias 0, 4 e 8 metros em Braquiária+Gliricídia e Braquiária+Sabiá.

4.4 Efeito do sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas sobre a abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos

Para todos os grupos de micro-organismos avaliados a maior abundância foi observada em B+L, não havendo diferença significativa apenas para AOB. Também foram observadas diferenças significativas no número de cópias do gene *nifH* entre B+L 0m e B, onde as comunidades de diazotróficos foram mais abundantes em B+L 0m (Figura 7).

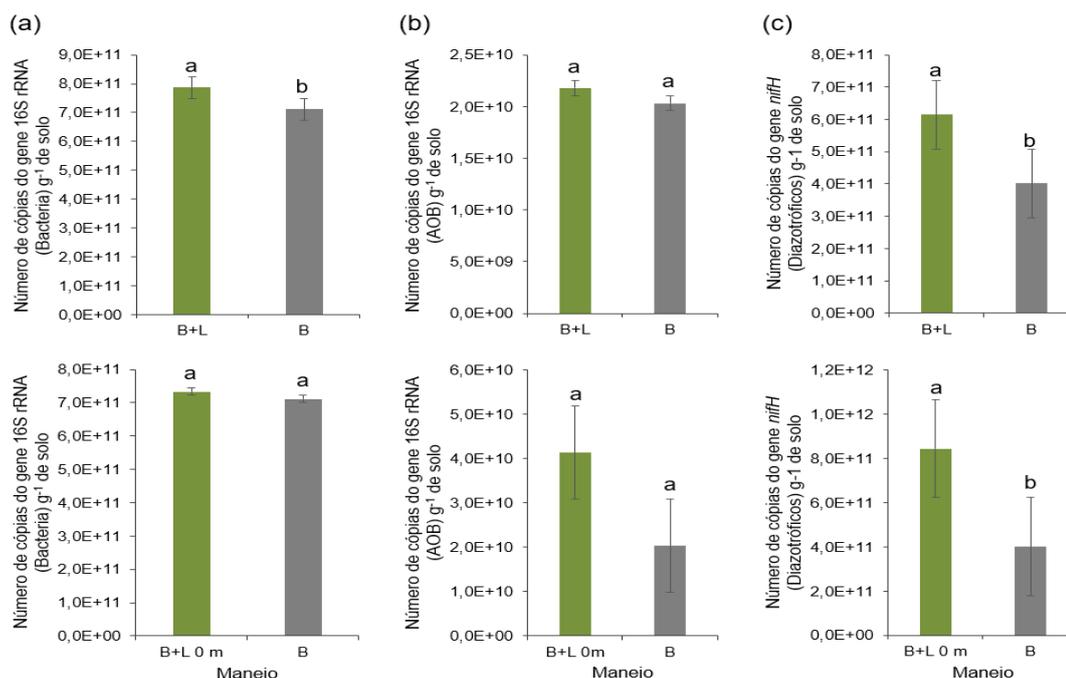


Figura 7. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em solos sob sistema silvipastoril e sob braquiária em cultivo solteiro. B+L: consórcio gramínea + leguminosa (média das distâncias); B+L 0 m: faixa de leguminosas, B: braquiária solteira. Barras de erro representam o erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes, em cada gráfico, diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de t

A abundância de bactérias totais foi significativamente afetada pela interação Estação climática x Distância, onde observou-se diferenças significativas entre distâncias somente na época úmida, com maior número de cópias do 16S rRNA de Bactéria nos pontos mais afastados das leguminosas. Esse resultado pode está associado a maior produção de massa de forragem pela braquiária nos pontos mais afastados das leguminosas nessa estação (COÊLHO, 2016), levando à maior deposição serrapilheira e, com isso, maior abundância de bactérias. Só foi observada diferença significativa entre as estações a zero metros (0 m), com maior abundância na estação seca (Figura 8).

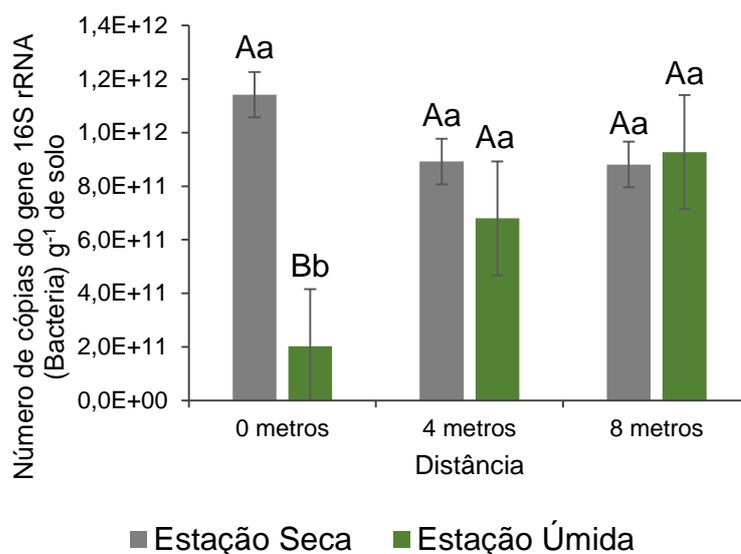


Figura 8. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total em solos sob sistema silvipastoril a diferentes distâncias a partir das leguminosas, em estações climáticas distintas. Modelo: Componentes de variância, AIC = 0,7. Barras da mesma cor seguidos de letras maiúsculas idênticas, ou barras de cores diferentes seguidas por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey

Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa na abundância de AOB entre B+L e B, observou-se diferenças significativas na abundância dessas comunidades entre as distâncias a partir das leguminosas, onde as amostras coletadas a 0 m apresentaram maior número de cópias do 16S rRNA de β -proteobactéria amônio-oxidantes quando comparadas às coletadas a quatro e oito metros (4 e 8 m) (Figura 9a). As comunidades de diazotróficos não apresentaram efeito significativo da distância, mas mostram maior abundância a 0 m (Figura 9b).

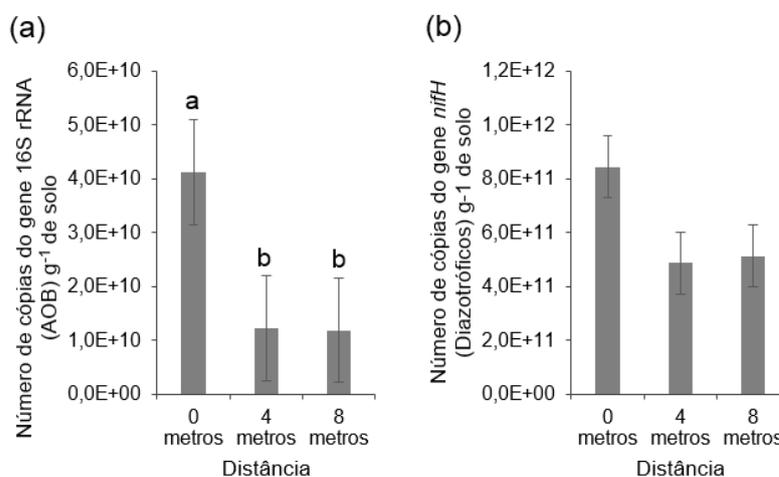


Figura 9. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (a) e do gene *nifH* de diazotróficos (b) em solos sob sistema silvipastoril em diferentes distâncias a partir das leguminosas. Modelo: Componentes de variância, AIC = 0,7. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey

A maior abundância de bactérias totais em B+L é provavelmente resultado da maior rizodeposição de compostos orgânicos via exsudados pelas leguminosas e sua maior capacidade de alterar os atributos físicos do solo (como porosidade, umidade e temperatura), resultando na formação de mais micro-habitats para bactérias (MOURA et al., 2015; WANG et al., 2015), além da melhor fertilidade do solo devido a deposição de serrapilheira (SILVA et al., 2013a).

Apesar da influência da disponibilidade de N na abundância das comunidades de nitrificadores (CHEN et al., 2015; MEYER et al., 2013), uma vez que não houve diferença significativa no teor de NH_4^+ entre os tratamentos, pode-se atribuir a menor abundância de AOB em B, e nos pontos mais distantes das leguminosas, à exsudação de inibidores de nitrificação pela braquiária. As pastagens do gênero *Brachiaria* são conhecidas por exsudar compostos orgânicos complexos, como ácidos fenólicos metilados e terpenos, capazes de bloquear a enzima amônio monooxigenase, reduzindo a nitrificação (SUBBARAO et al., 2009; GOPALAKRISHNAN et al., 2007), processo que fornece energia para a fixação de CO_2 pelas AOB.

A maior abundância do gene *nifH* em B+L e em B+L 0 m, por sua vez, pode estar relacionada a secreção de compostos químicos sinalizadores pelas leguminosas, os quais estimulam a multiplicação de bactérias fixadoras de N (JANCZAREK et al., 2015).

De maneira geral, nota-se que o consórcio de braquiária com Gliricídia ou Sabiá contribui para o aumento da abundância de bactérias e organismos diazotróficos do solo, os quais atuam desde a decomposição da matéria orgânica às reações bioquímicas de transformação dos elementos (RASHID et al., 2016), sendo fundamentais para a manutenção da qualidade do solo. Uma vez que a abundância de diazotróficos está associada a sua atividade (HUANG et al., 2011; PEREZ et al., 2016), é possível presumir que há maior fixação biológica de N nos tratamentos com consórcio gramínea + leguminosa.

4.5 Efeito da estação climática sobre a abundância de bactérias totais, amônio-oxidantes e diazotróficos

Foi observada maior abundância de bactérias totais e diazotróficos na estação seca, enquanto AOB foi mais abundante na estação úmida (Figura 10). Esses resultados concordam com a equitabilidade dessas comunidades microbianas (Tabela

9), o que confirma que as comunidades de bactéria total e diazotróficos não foram afetadas pela baixa umidade na estação seca. A capacidade das bactérias de resistirem à restrição hídrica está associada a mecanismos adaptativos adquiridos ao serem submetidas a um regime histórico de precipitação ao longo dos anos, mecanismos que podem estar associados à mudança na estrutura e abundância das comunidades microbianas (EVANS; WALLENSTEIN, 2014).

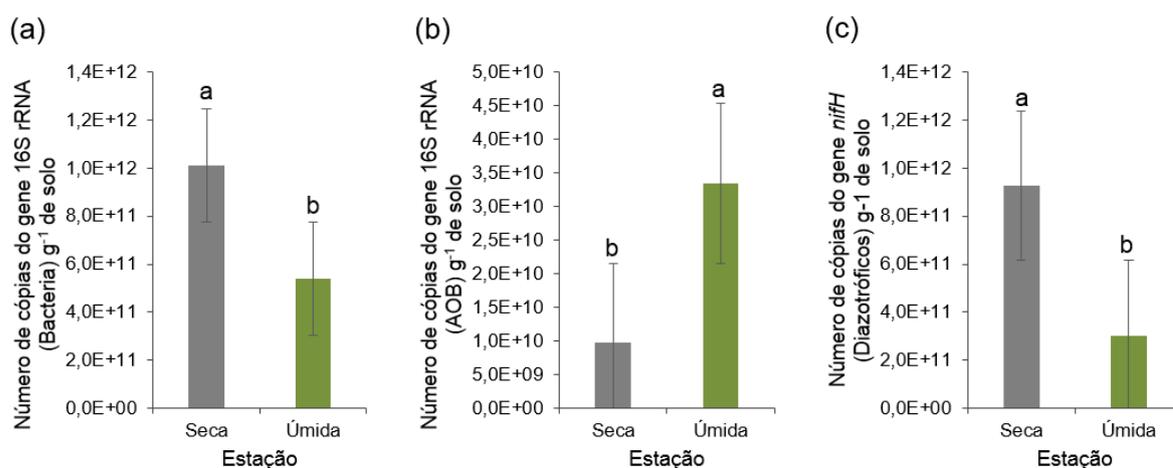


Figura 10. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria total (a), do gene 16S rRNA de bactérias amônio oxidantes (AOB) (b) e do gene *nifH* de diazotróficos (c) em estações climáticas distintas. Barras de erro representam o erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes, em cada gráfico, diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de t

Di et al. (2014) também observaram aumento na abundância de AOB com o aumento da umidade do solo em pastagens na Nova Zelândia. A maior umidade do solo afeta a eficiência dos compostos inibidores de nitrificação secretados pela pastagem, permitindo a atividade das AOB, aumentando sua abundância (DI et al., 2014).

4.6 Análise de componentes principais (PCA) e correlação entre os atributos químicos do solo e as comunidades microbianas

Os resultados da análise de componentes principais (PCA) mostraram que os tratamentos se agrupam de forma distinta, em ambos os consórcios gramínea + leguminosa e estações do ano (Figuras 11 e 12), sendo semelhantes aos resultados das análises de agrupamento hierárquico (Figuras 5 e 6).

Na estação seca, os eixos PC1 e PC2 explicaram 29% da variabilidade dos dados para B+G, enquanto para B+S explicaram 32,2% (Figura 11a e 11b).

Na estação úmida, os dois primeiros eixos (PC1 e PC2) explicaram 30% da variabilidade dos dados para B+G, enquanto para B+S a explicação foi de 31,1%.

Na estação seca, observou-se correlações significativas entre a abundância de AOB e o teor de Ca^{2+} (Spearman $[\rho] = 0,60$; p value $< 0,05$) e AOB e a CTC do solo (Spearman $[\rho] = 0,67$; p value $< 0,05$) em B+G, enquanto em B+S observou-se correlação significativa entre abundância de AOB o teor de K^+ (Spearman $[\rho] = 0,62$; p value $< 0,05$) (APÊNDICE A). Atribuí-se esses resultados à influência da capacidade de troca de cátions na abundância de bactérias no solo, a qual mantém o pH em condições favoráveis ao crescimento bacteriano por meio da substituição dos íons H^+ produzidos durante o metabolismo por cátions básicos (STOTZKY, 1966).

Também foi observada correlação positiva entre o teor de fósforo disponível e a abundância do gene *nifH* (Spearman $[\rho] = 0,68$; p value $< 0,05$), o que ocorre possivelmente devido à demanda de adenosina trifosfato (ATP) pelos diazotróficos para a FBN, dessa forma a disponibilidade de P pode elevar a atividade dos diazotróficos, resultando no aumento da sua abundância (HUHE et al., 2014).

Na estação úmida, observou-se correlação negativa entre o teor de amônio (NH_4^+) e a abundância do gene *nifH* em B+S (Spearman $[\rho] = -0,81$; p value $< 0,01$) (APÊNDICE B), mostrando que a alta disponibilidade de N no solo pode suprimir a atividade e, com isso, a abundância dos diazotróficos (ORR et al., 2011).

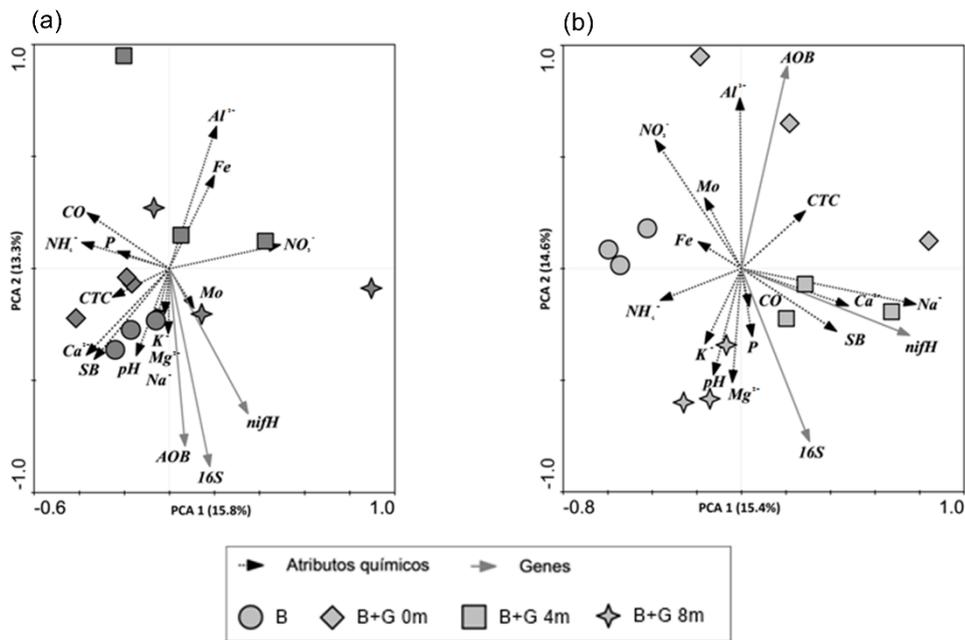


Figura 11. Biplot dos componentes principais com os dados de qPCR, DGGE e atributos químicos do solo sob sistema silvipastoril com Gliricídia na estação seca (a) e úmida (b). Os símbolos representam as amostras (B: Braquiária; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros). As setas pontilhadas representam os atributos químicos do solo. As setas contínuas representam as comunidades microbianas (16S: Bacteria; AOB: Bactérias amônio oxidantes; *nifH*: Diazotróficos)

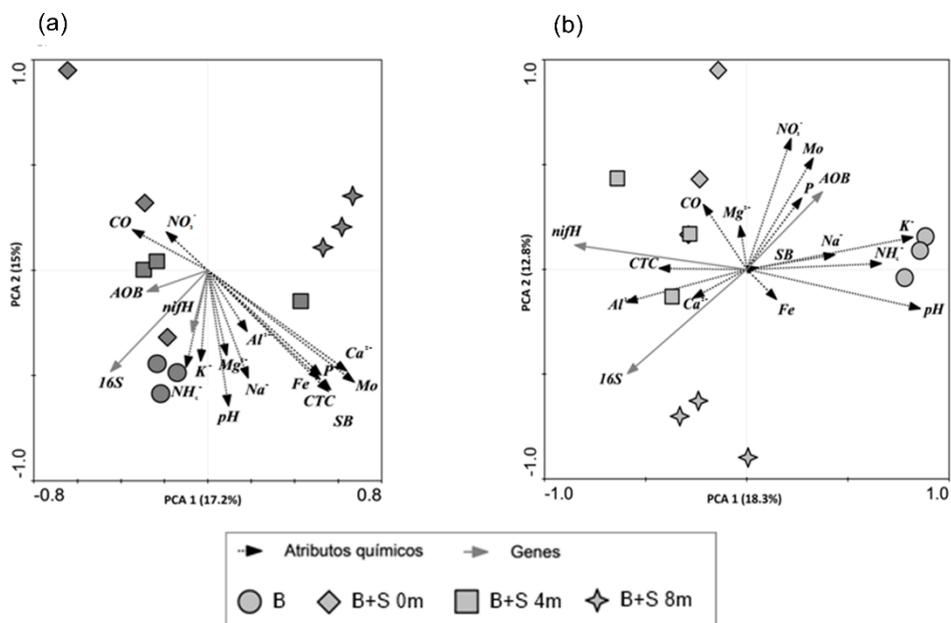


Figura 12. Biplot dos componentes principais com os dados de qPCR, DGGE e atributos químicos do solo sob sistema silvipastoril com Sabiá na estação seca (a) e úmida (b). Os símbolos representam as amostras (B: Braquiária; B+G0m: Braquiária + Gliricídia a zero metros; B+G4m: Braquiária + Gliricídia a quatro metros; B+G8m: Braquiária + Gliricídia a oito metros). As setas pontilhadas representam os atributos químicos do solo. As setas contínuas representam as comunidades microbianas (16S: Bacteria; AOB: Bactérias amônio oxidantes; *nifH*: Diazotróficos).

5. CONCLUSÕES

O sistema silvipastoril com leguminosas determina a estrutura das comunidades de bactérias totais, bactérias amônio oxidantes e diazotróficos do solo provavelmente por meio da atuação de compostos orgânicos exsudados pelas leguminosas e nutrientes adicionados por sua serapilheira;

A estrutura das comunidades de bactérias totais, bactérias amônio oxidantes e diazotróficos do solo difere em função da distância a partir das leguminosas em sistema silvipastoril e em função da estação do ano, o que destaca a dinâmica espacial e temporal dessas comunidades no sistema silvipastoril;

A diversidade genética e equitabilidade de organismos diazotróficos é favorecida pelo manejo silvipastoril devido à presença das leguminosas;

O sistema silvipastoril com leguminosas promove maior abundância de bactérias totais, AOB e diazotróficos no solo por promover melhores condições para o crescimento microbiano;

A abundância de bactérias totais e bactérias amônio oxidantes difere em função da distância a partir das leguminosas em sistema silvipastoril;

As comunidades de bactérias totais e diazotróficos são mais abundantes na estação seca, o que mostra que são adaptadas ao regime hídrico local e se beneficiam pelo maior teor de nutrientes no solo nessa estação. Enquanto as bactérias amônio oxidantes são mais abundantes na estação úmida, provavelmente devido ao menor efeito negativo da braquiária sobre essas comunidades nessa estação;

A capacidade de troca de cátions exerce influência positiva sobre as bactérias amônio oxidantes do solo por meio da manutenção do pH em níveis favoráveis ao crescimento bacteriano. O teor de fósforo disponível afeta positivamente os organismos diazotróficos do solo, enquanto o teor de amônio tem influência negativa sobre essas comunidades, o que ocorre por beneficiarem e restringirem, respectivamente, a FBN.

6. REFERÊNCIAS

ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of microbiology**, Nova York, v. 178, n. 2, p. 161-164, 2002.

ALLABY, M. **Oxford Dictionary of Plant Sciences**. 3 ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2012. p. 224. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=wzZGQOmcyjAC&printsec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. Acesso em 11 de ago. 2017.

ALMEIDA, B.G.; DONAGEMMA, G.K.; RUIZ, H.A.; BRAIDA, J.A.; VIANA, J.H.M.; REICHERT, J.M.M.; OLIVEIRA, L.B.; CEDDIA, M.B.; WADT, P.S.; FERNANDES, R.B.A.; PASSOS, R.R.; DECHEN, S.C.F.; KLEIN, V.A.; TEIXEIRA, W.G. Padronização de métodos para análise granulométrica no Brasil. **Embrapa Solos- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2012.

ALVEY, S.; YANG, C.H.; BUERKERT, A.; CROWLEY, D.E. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. **Biology and Fertility of Soils**, Nova York, v. 37, n. 2, p. 73–82, 2003.

APOLINÁRIO, V.X.O.; DUBEUX, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, R.L.C.; MELLO, A.C.L.; SANTOS, M.V.F.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MUIR, J.P. Tree legumes provide marketable wood and add nitrogen in warmclimate silvopasture systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, n. 5, p. 1915-1921, 2015.

APOLINÁRIO, V.X.O.; DUBEUX, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, R.L.C.; MELLO, A.C.L.; COELHO, D. L.; SAMPAIO, E.V. Decomposition of Arboreal Legume Fractions in a Silvopastoral System. **Crop Science**, Madison, v. 56, n. 3, p. 1356-1363, 2016.

ASHWORTH, A.J.; WEST, C.P.; ALLEN, F.L.; KEYSER, P.D.; WEISS, S.A.; TYLER, D.D.; TAYLOR, A.M.; WARWICK, K.L.; BEAMER, K.P. Biologically fixed nitrogen in legume intercropped systems: comparison of nitrogen-difference and nitrogen-15 enrichment techniques. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, n. 6, p. 2419-2430, 2015.

BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S. A degradação das pastagens e o ciclo do nitrogênio. In: WORKSHOP NITROGÊNIO NA SUSTENTABILIDADE DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO PECUÁRIA, 2000, Dourados. **Anais...** Dourados, MS: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 110-124.

BOWATTE, S.; BARRETT, B.; LUSCOMBE, C.; HUME, D.E.; LUO, D.; THEOBALD, P.; NEWTON, P.C.D. Effect of grass species and fungal endophyte on soil nitrification potential. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Abingdon, v. 54, n. 4, p. 275-284, 2011.

BOWATTE, S.; NEWTON, P.C.D.; HOOGENDOORN, C.J.; HUME, D.E.; STEWART, A.V.; BROCK, S.C.; THEOBALD, P.W. Wide variation in nitrification activity in soil associated with different forage plant cultivars and genotypes. **Grass and Forage Science**, Hoboken, v. 71, n. 1, p. 160–171, 2015.

BRESSAN, M.; GATTIN, I.T.; DESAIRE, S.; CASTEL, L.; GANGNEUX, C.; LAVAL, K. A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 88, p. 60–68, 2015.

CAMERON, K.C.; DI, H.J.; MOIR, J.L. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 162, n. 2, p. 145–173, 2013.

CANFIELD, D.E.; GLAZER, A.N.; FALKOWSKI, P.G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, New York, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Sabiá-Mimosa caesalpinifolia**. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2007.

CENCIANI, K.; LAMBAIS, M.R.; CERRI, C.C.; AZEVEDO, L.C.B.; FEIGL, B.J. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 907-916, 2009.

CERRO, P.; SANTOS, A.A.P.R.; GOMES, D.F.; MARKS, B.B.; PÉREZ-MONTAÑO, F.; CARVAJAL, M.G.A.R.; NAKATANI, A.S.; GIL-SERRANO, A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F.J.; HUNGRIA, M. Regulatory nodD1 and nodD2 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. **BMC Genomics**, Londres, v. 16, n. 1; p. 1-13, 2015.

CHEN, B.; LIU, E.; TIAN, Q.; YAN, C.; ZHANG, Y. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 2, p. 429–442. 2014.

CHEN, Z.; GUO, Y.; DU, Z.; WU, W.; MENG, F. Change in the abundance and community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea at soil aggregate level as native pasture converted to cropland in a semiarid alpine steppe of central Asia. **Journal of soils and sediments**, Heidelberg, v. 16, n. 1, p. 243-254, 2016.

COELHO, D.L. **Características estruturais e produtivas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em monocultivo e em sistemas silvipastoris, na Zona da Mata de Pernambuco**. 2016. 79 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2016.

COELHO, K.P.; RIBEIRO, P. R.A.; MOURA, E.G.; AGUIAR, A.D.C.F.; RODRIGUES, T.L.; MOREIRA, F.M.S. Symbiosis of rhizobia with *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 40, n. 1, 2018.

COMPANHIA PERNAMBUCANA RECURSOS HÍDRICOS - CPRH. **Diagnóstico sócio ambiental do Litoral Norte de Pernambuco**. Recife, 2003. 214p.

CUBILLOS, A.M.; VALLEJO, V.E.; ARBELI, Z.; TERÍAN, W.; DICK, R.P.; MOLINA, C.H.; MOLINA, E.; ROLDAN, F. Effect of the conversion of conventional pasture to intensive silvopastoral systems on edaphic bacterial and ammonia oxidizer communities in Colombia. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 72, p. 42-50, 2016.

DAIMS, H.; LEBEDEVA, E.V.; PJEVAC, P.; HAN, P.; HERBOLD, C.; ALBERTSEN, M.; JEHLICH, N.; PALATINSZKY, M.; VIERHEILIG, J.; BULAEV, A.; KIRKEGAARD, R.H.; BERGEN, M.; RATTEI, T.; BENDINGER, B.; NIELSEN, P.H.; WAGNER, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature**, Londres, v. 528, n. 7583, p. 504-509, 2015.

DI, H.J.; CAMERON, K.C.; PODOLYAN, A.; ROBINSON, A. Effect of soil moisture status and a nitrification inhibitor, dicyandiamide, on ammonia oxidizer and denitrifier growth and nitrous oxide emissions in a grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 73, p. 59-68, 2014.

DIALLO, M.D.; MARTENS, M.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S. Phylogenetic analysis of partial bacterial 16s rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Senegal. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 27, n. 2, p. 238-252, 2004.

DIAS, A.C.F.; HOOGWOUT, E.F.; SILVA, M.C.P.; SALLES, J.F.; OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 50, p. 85-95, 2012.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.M.; AZEVEDO, B.C.; VIEIRA, M.S.; COLOMBARI, A.A.; DIAS, J.; FRANCO, A.A. Estabelecimento de leguminosas arbóreas em pastos de capim-marandu e tanzânia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1413-1419, 2008.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.M.; FRANCO, A.A. Leguminosas arbóreas introduzidas em pastagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 119-126, 2007.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, n. 8, p. 621, 2004.

DYNARSKI, K.A.; HOULTON, B.Z. Nutrient limitation of terrestrial free-living nitrogen fixation. **New Phytologist**, Hoboken, v. 217, n. 3, p. 1050-1061, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ed. Rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 672p. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006. 306p.

EVANS, S.E.; WALLENSTEIN, M.D. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. **Ecology letters**, Hoboken, v. 17, n. 2, p. 155-164, 2014.

FAO. **FAOSTAT: Land use**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>. Acesso em: 03 de abr. 2018.

FLORENTINO, L.A.; REZENDE, A.V.; MESQUITA, A.C.; LIMA, A.R.S.; MARQUES, D.J.; MIRANDA, J.M. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, Mendoza, v. 37, n. 3, p. 320-338, 2014.

FONTE, L.; MACHADO, R.; DÍAZ, M.; BLANCO, D. Caracterización morfológica de *Gliricidia sepium*, composición bromatológica y proporción de azúcares en sus flores. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, v. 36, n. 4, p. 423-428, 2013.

FONTES, R.L.; DALLPAI, D.L.; BRAGA, J.M.; ALVAREZ V, V.H. Determination of molybdenum in soil test extracts with potassium iodide plus hydrogen peroxide reaction. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Filadélfia, v. 31, n. 15-16, p. 2671-2683, 2000.

GABY, J.C.; BUCKLEY, D.H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 7, p. e42149, 2012.

GALDINO, S.; SANO, E.E.; ANDRADE, R.G.; GREGO, C.R.; NOGUEIRA, S.F.; BRAGANTINI, C.; FLOSI, A.H.G. Large-scale modeling of soil erosion with rusle for conservationist planning of degraded cultivated brazilian pastures. **Land Degradation & Development**, Hoboken, v. 27, n. 3, p. 773-784, 2015.

GAO, H.; ZHANG, W.; SONG, Z.; YANG, X.; YANG, L.; CAO, M.; WANG, D.; LIAO, G. Transfer behavior of odorous pollutants in wastewater sludge system under typical chemical conditioning processes for dewaterability enhancement. **Scientific reports**, Londres, v. 7, n. 1, p. 3417, 2017.

GARCIA, G.; CARDOSO, A.A. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, p. 1468-1476, 2013.

GIMENES, F.M.A.; BARBOSA, H.Z.; GERDES, L.; GIACOMINI, A.A.; BATISTA, K.; MATTOS, W.T.; PREMAZZI, L.M.; MIGUEL, A.N.V. The utilization of tropical legumes to provide nitrogen to pastures: A review. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v. 12, n. 2, p. 85-92, 2017.

GONZALEZ, A.M.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; CLEMENTINO, M.M.; ALBANO, R.M.; MENDONÇA-HAGLER, L.; MARTINS, O.B.; PARANHOS, P. Diversity of bacterial communities related to the nitrogen cycle in a coastal tropical bay. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 34, n. 4, p. 3401-3407, 2012.

GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Nitrification inhibitors from the root tissues of *Brachiaria humidicola*, a tropical grass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1385-1388, 2007.

GUARDA, V.D.A.; GUARDA, R.D.A. Brazilian tropical grassland ecosystems: distribution and research advances. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 7, p. 924-932, 2014.

GUPTA, V.V.S.R.; KROKER, S.J.; HICKS, M.; DAVOREN, C.W.; DESCHEEMAER, K.; LLEWELLYN, R. Nitrogen cycling in summer active perennial grass systems in South Australia: non-symbiotic nitrogen fixation. **Crop and Pasture Science**, Clayton, v. 65, n. 10, p. 1044-1056, 2014.

HEIL, J.; VEREECKEN, H.; BRÜGGEMANN, N. A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. **European Journal of Soil Science**, Paris, v. 67, n. 1, p. 23-39, 2016.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, Weinheim, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HILL, T.C.J.; WALSH, K. A.; HARRIS, J. A.; MOFFETT, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2003.

HOFFMAN, B.M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.Y.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L.C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014.

HU, H. W., ZHANG, L. M., YUAN, C. L., & HE, J. Z. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 64, p. 18-27, 2013.

HUANG, L.N.; TANG, F.Z.; SONG, Y.S.; WAN, C.Y.; WANG, S.L.; LIU, W.Q.; SHU, W.S. Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 439-450, 2011.

HUHE; BORJIGIN, H.S.; CHENG; NOMURA, N.; NAKAJIMA, T.; NAKAMURA, T.; UCHIYAMA, T. Effect of abandonment on diversity and abundance of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in the cropland soils of Hulun Buir, Inner Mongolia. **Plos One**, São Francisco, v. 9, n. 9, p. e106714, 2014.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.AT. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO - IPA. **Banco de dados agrometeorológicos**. Recife: 1994.100p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf. Acesso em: 03 out. 2016.

IVLEVA, N.B.; GROAT, J.; STAUB, J.M.; STEPHENS, M. Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, n. 8, p. e0160951, 2016.

JACOMINE, P.K.T.; CAVALCANTI, A.C.; BURGOS, N.; PESSOA, S.C.P.; SILVEIRA, C.O. **Levantamento exploratório-reconhecimento de solos do estado de Pernambuco**. Recife, Ministério da Agricultura/Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste, 1973. v. 1. 359p. Boletim técnico, v. 26.

JANCZAREK, M.; RACHWA, K.; MARZEC, A.; GRZADZIEL, J.; PALUSINSKA-SZYSZ, M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 85, p. 94–113, 2015.

JEANBILLE, M.; BUÉE, M.; BACH, C.; CÉBRON, A.; FREY-KLETT, P.; TURPAULT, M. P.; UROZ, S. Soil parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities across temperate beech forest soil sequences. **Microbial Ecology**, Nova York, v. 71, n. 2, p. 482-493, 2016.

KEUTER, A.; VELDKAMP, E.; CORRE, M.D. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 70, p. 38-46, 2014.

KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; DE BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. Analysis of β -proteobacteria ammonia-oxidizing bacteria in coastal sand dunes using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1489-1497, 1997.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 12–24, 2012.

LAUBER, C.L.; RAMIREZ, K.S.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **ISME Journal**, Londres, v. 7, n. 8, p. 1641–1650, 2013.

LEFFA, J.W.; JONES, S.E.; PROBERD, S.M.; BARBERÁNA, A.; BORERE, E.T.; FIRNF, J.L.; HARPOLEG, W.S.; HOBBIIE, S.E.; HOFMOCKELJ, K.S.; KNOPSK, J.M.H.; MCCULLEYL, R.L.; PIERREM, K.L.; RISCHN, A.C.; SEABLOOMO, E.W.; SCHÜTZN, M.; STEENBOCKB, C.; STEVENSP, C.J.; FIERER, N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 35, p. 10967-10972, 2015.

LEPŠ, J.; ŠMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge university press, 2003. 376 p.

LEVY-BOOTH, D.J.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 11-25, 2014.

Li, Y.; Chapman, S.J.; Nicol, G.W.; Yao, H. Nitrification and nitrifiers in acidic soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 116, p. 290-301, 2018.

LIMA-PERIM, J.E.; ROMAGNOLI, E.M.; DINI-ANDREOTE, F.; DURRER, A.; DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D. Linking the composition of bacterial and archaeal communities to characteristics of soil and flora composition in the Atlantic Rainforest. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 11, n. 1, p. e0146566, 2016.

LIRA JR, M.A.; NASCIMENTO, L.R.S.; FRACETTO, G.G.M. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 6, n. 945, 2015.

LIU, JIANYIN; PENG, MENGJUN; LI, YOUGUO. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nifH* gene from mangrove rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, n. 4, p. 531-539, 2012.

LOBATO, J.F.P.; FREITAS, A.K.; DEVINCENZI, T.; CARDOSO, L.L.; TAROUCOA, J.U.; VIEIRA, R.M.; DILLENBURG, D.R.; CASTROB, I. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 336–345, 2014.

LUO, J.; TILLMAN, R.W.; BALL, P.R. Factors regulating denitrification in a soil under pasture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 913-927, 1999.

MACEDO, M.C.M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n. 1, p.133-146, 2009.

MARTINS, P.G.S; JUNIOR, M.A.L.; FRACETTO, G.G.M.; SILVA, M.L.R.B; VINCENTIN, R.P. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Nova York, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015.

- MARTUSCELLO, J.A.; JANK, L.; GONTIJO NETO, M.M.; LAURA, V.A.; CUNHA, D.N.F.V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n. 7, p.1183-1190, 2009.
- MENDES, L.W.; TSAI, S.M.; NAVARRETE, A.A.; HOLLANDER, M.; VAN VEEN, J.A.; KURAMAE, E.E. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, Nova York, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015.
- MENDES, M.M.C.; CHAVES, L.F.C.; PONTES NETO, T.P.; SILVA, J.A.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. Crescimento e sobrevivência de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) inoculadas com micro-organismos simbiotes em condições de campo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 309-320, 2013.
- MENDES, W.C.; ALVES JÚNIOR, J.; CUNHA, P.C.R.; SILVA, A.R.; EVANGELISTA, A.W.P.; CASAROLI, D. Lixiviação de nitrato em função de lâminas de irrigação em solos argiloso e arenoso. **Irriga**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 47-56, 2015.
- MEYER, A.; FOCKS, A.; RADL, V.; KEIL, D.; WELZL, G.; SCHÖNING, I.; BOCH, S.; MARHAN, S.; KANDELER, E.; SCHLOTTER, M. Different land use intensities in grassland ecosystems drive ecology of microbial communities involved in nitrogen turnover in soil. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 9, p. e73536, 2013.
- MOHAMMADI, K., SOHRABI, Y., HEIDARI, G., KHALESRO, S., & MAJIDI, M. Effective factors on biological nitrogen fixation. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v. 7, n. 12, p. 1782-1788, 2012.
- MOREIRA, F.M.D.S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Piauí, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.
- MOURA, E.G.; AGUIAR, A.C.F.; PIEDADE, A.R.; ROUSSEAU, G.X. Contribution of legume tree residues and macrofauna to the improvement of abiotic soil properties in the eastern Amazon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 86, p. 91-99, 2015.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 2, n. 3, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- MUYZER, G; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.
- 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**, Washington, v. 10, n. 11, p. 2966-2978, 2008.

NOGUEIRA, A.K.S.; RODRIGUES, R.A.R.; CASTRO, B.S.; NOGUEIRA, T.F.; SILVA, J.J.N.; MOMBACH, M.B.M.; ARMACOLO, N.; SILVEIRA, J.G. Emissões de óxido nitroso e metano do solo em áreas de recuperação de pastagens na Amazônia mato-grossense. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 937-943, 2015.

OLIVEIRA, C.S. **Diversidade fenotípica de rizóbios isolados de sabiá nativos de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2011.

ORR, C.H.; JAMES, A.; LEIFERT, C.; COOPER, J. M.; CUMMINGS, S.P. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 911–919, 2011.

OZIER-LAFONTAINE, H.; LECOMPTE, F.; SILLON, J.F. Fractal analysis of the root architecture of *Gliricidia sepium* for the spatial prediction of root branching, size and mass: model development and evaluation in agroforestry. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 209, n. 2, p. 167-179, 1999.

PABINGER, S.; RÖDIGER, S.; KRIEGNER, A.; VIÉRLINGERA, K.; WEINHÄUSELA, A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 23–33, 2014.

PATRA, A.K.; ABBADIE, L.; CLAYS-JOSSERAND, A.; DEGRANGE, V.; GRAYSTON, S.J.; LOISEAU, P.; LOUAULT, F.; MAHMOOD, S.; NAZARET, S.; PHILIPPOT, L.; POLY, F.; PROSSER, J.I.; RICHAUME, A.; ROUX, X.L. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. **Ecological Monographs**, Hoboken, v. 75, n. 1, p. 65-80, 2005.

PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular markers in phylogenetic studies-A review. **Phylogenetics & Evolutionary Biology**, Chicago, v. 2, p. 100-131, 2014.

PEOPLES, M.B.; BROCKWELL, J.; HUNT, J.R.; SWAN, A.D.; WATSON, L.; HAYES, R.C.; LI, G.D.; HACKNEY, B.; NUTTALL, J.G.; DAVIES, S.L.; FILLERY, I.R.P. Factors affecting the potential contributions of N₂ fixation by legumes in Australian pasture systems. **Crop and Pasture Science**, Clayton, v. 63, n. 9, p. 759-786, 2013.

PEREZ, P.G.; YE, J.; WANG, S.; WANG, X.; HUANG, D. Analysis of the occurrence and activity of diazotrophic communities in organic and conventional horticultural soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 79, p. 37-48, 2014.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 95-103, 2001.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A.C.; CORRÊA, L.A.; SILVA, A.G.; CANTARELLA, H. Lixiviação de nitrato em pastagem de coastcross adubada com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 683-690, 2006.

- QU, T.; DU, W.; YUAN, X.; YANG, Z.; LIU, D.; WANG, D.; YU, L. Impacts of grazing gntensity and plant community composition on soil bacterial community diversity in a steppe grassland. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, n. 7, p. e0159680, 2016.
- RAIJ, B.; CAMARGO, O.A. Nitrate elution from soil columns of three Oxisols and one alfisol. In: International Congress of Soil Science, 10., 1974, Moscow. **Transactions...** Moscow: Nauka Publ. House, 1974. p.385-391.
- RASHID, M.I.; MUJAWAR, L.H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I.M.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 26-41, 2016.
- REIS, R.C.R.; PELACANI, C.R.; ANTUNES, C.G.C.; DANTAS, B.F.; CASTRO, R.D. Physiological quality of *Gliricidia sepium* (jacq.) steud. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 229-235, 2012.
- RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E.C.; PAULA, F.S.; MIRZA, B.; HAMAOU, G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J.M.; BOHANNAN, B.J.M.; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **PNAS**, Washington, v.110, n. 3, p. 988-993, 2013.
- ROSOLEM, C.A.; CALONEGO, J.C.; FOLONI, J.S.S. Lixiviação de potássio da palha de espécies de cobertura de solo de acordo com a quantidade de chuva aplicada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 355-362, 2003.
- ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P.C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, Londres, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.
- ROUX, X.L.; POLY, F.; CURREY, P.; COMMEAUX, C.; HAI, B.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHLOTTER, M.; ATTARD, E.; KLUMPP, K. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. **ISME Journal**, Londres, v. 2, n. 2, p. 221-232, 2008.
- ROUX, X.L.; SCHMID, B.; POLY, F.; BARNARD, R.L.; NIKLAUS, P.A.; GUILLAUMAUD, N.; HABEKOST, M.; OELMANN, Y.; PHILIPPOT, L.; SALLES, J.F.; SCHLOTTER, M.; STEINBEISS, S.; WEIGELT, A. Soil environmental conditions and microbial build-up mediate the effect of plant diversity on soil nitrifying and denitrifying enzyme activities in temperate grasslands. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 4, p. e61069, 2013.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.

SANTOS, A.B. **Diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris com leguminosas arbóreas e braquiária**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2017.

SANTOS, C.A.; KRAWULSKI, C.C.; BINI, D.; GOULART FILHO, T.; KNOB, A.; MEDINA, C.C.; ANDRADE FILHO, G.; NOGUEIRA, M.A. Reclamation status of a degraded pasture based on soil health indicators. **Scientia Agricola**, Cerqueira Cesar, v. 72, n. 3, p. 195-202, 2015.

SAHRAWAT, K.L. Factors affecting nitrification in soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Filadélfia, v. 39, n. 9-10, p. 1436-1446, 2008.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Chicago: University of Illinois Press, 1963. 125p.

SHARMA, S.; ANEJA, M.K.; MAYER, J.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. **Microbial Ecology**, Nova York, v. 49, n. 3, p. 407–415, 2005.

SHEIK, C.S.; BEASLEY, W.H.; ELSHAHED, M.S.; ZHOU, X.; LUO, Y.; KRUMHOLZ, L.R. Effect of warming and drought on grassland microbial communities. **ISME Journal**, Londres, v. 5, n. 10, p. 1692-1700, 2011.

SILVA, A.B.; LIRA JUNIOR, M.A.; DUBEUX JUNIOR, J.C.B.; FIGUEIREDO, M.V.B.; VICENTIN, R.P. Estoque de serapilheira e fertilidade do solo em pastagem degradada de *Brachiaria decumbens* após implantação de leguminosas arbustivas e arbóreas forrageiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 502-511, 2013a.

SILVA, A.S.; SILVA, I.F.; FERREIRA, L.E.; BORCHARTT, L.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, W.F. Propriedades físicas e químicas em diferentes usos do solo no brejo paraibano. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 4, p. 1064-1072, 2013b.

SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 225, p.21-30, 2010.

SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3278-3286, 1991.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, Londres, v. 163, p. 688, 1949.

SONTHIPHAND, P.; HALL, M.W.; NEUFELD, J.D. Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 5, p. 399, 2014.

SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: Novais, R.F.; Alvarez V., V.H.; Barros, N.F.; Fontes, R.L.; Cantarutti, R.B.; Neves, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.205-274.

SPARLING, G.P.; CHIBNALL, E.J.; PRONGER, J.; RUTLEDGE, S.; WALL, A.M.; CAMPBELL, D.I.; SCHIPPER, L.A. Estimates of annual leaching losses of dissolved organic carbon from pastures on Allophanic Soils grazed by dairy cattle, Waikato, New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Abingdon, v. 59, n. 1, p. 32-49, 2016.

SPATZAL, T.; SCHLESIER, J.; BURGER, E.V.; SIPPEL, D.; ZHANG, L.; ANDRADE, S.L.A.; REES, D.C.; EINSLE, O. Nitrogenase FeMoco investigated by spatially resolved anomalous dispersion refinement. **Nature Communications**, Londres, v. 7, n. 10902, 2016.

STOTZKY, G. Influence of clay minerals on microorganisms: III. Effect of particle size, cation exchange capacity, and surface area on bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 12, n. 6, p. 1235-1246, 1966.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.D.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHIA, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 41, p. 17302-17307, 2009.

SUGIYAMA, A.; UEDA, Y.; ZUSHI, T.; TAKASE, H.; YAZAKI, K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. **PLoS One**, São Francisco, v. 9, n. 6, p. e100709, 2014.

THOMAS, R.J. The role of the legume in the nitrogen cycle of productive and sustainable pastures. **Grass and Forage Science**, Hoboken, v. 47, n. 2, p.133-142, 1992.

TOURNA, M.; FREITAG, T.E.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 1357-64, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Livestock and poultry: world markets and trade**. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em 11 de ago. 2017.

VENDRAMINI, J.M.B.; DUBEUX JR., J.C.B.; SILVEIRA, M.L. Nutrient cycling in tropical pasture ecosystems. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.9, n.2, p.308-315, 2014.

VENDRAMINI, J.M.B.; SILVEIRA, M.L.A.; DUBEUX JR., J.C.B.; SOLLENBERGER, L.E. Environmental impacts and nutrient recycling on pastures grazed by cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, p.139-149, 2007.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 2, p. e57923, 2013.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 70, p. 23-32, 2013.

WANG, F.; LIANG, Y.; JIANG, Y.; YANG, Y.; XUE, K.; XIONG, J.; ZHOU, J.; SUN, B. Planting increases the abundance and structure complexity of soil core functional genes relevant to carbon and nitrogen cycling. **Scientific Reports**, Londres, v. 5, n. 1434, 2015.

WEIDNER, S.; KOLLER, R.; LATZ, E.; KOWALCHUK, G.; BONKOWSKI, M.; SCHEU, S.; JOUSSET, A. Bacterial diversity amplifies nutrient-based plant–soil feedbacks. **Functional Ecology**, Hoboken, v. 29, n. 10, p. 1341-1349, 2015.

WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum and Phosphorus Interact to Constrain Asymbiotic Nitrogen Fixation in Tropical Forests. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 3, p. e33710, 2012.

XAVIER, D.F.; LÉDO, F.J.S.; PACIULLO, D.S.C.; PIRES, M.F.A.; BODDEY, R.M. Dinâmica da serapilheira em pastagens de braquiária em sistema silvipastoril e monocultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 10, p. 1214-1219, 2011.

ZANARDO, M.; ROSSELLI, R.; MENEGHESSO, A.; SABLOK, G.; STEVANATO, P.; ALTISSIMO, A.; PERSERICO, L.; DEZUANI, V.; CONCHERI, G.; SCHLOTER, M.; SQUARTINI, A. Dynamics of soil prokaryotes catalyzing nitrification and denitrification in response to different fertilizers in a greenhouse experiment with *Cynodon dactylon*. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 76, p. 83-91, 2016.

ZOPPAS, F.M.; BERNARDES, A.M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 29-42, 2016.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A - Coeficientes de correlação de Spearman (ρ) entre atributos químicos do solo e o número de cópias do 16S rRNA (Bacteria e AOB) e *nifH* na estação seca

Braquiária + Gliricídia				Braquiária + Sabiá			
	Bacteria	AOB	<i>nifH</i>		Bacteria	AOB	<i>nifH</i>
Bacteria	1			Bacteria	1		
AOB	0,30 ^{ns}	1		AOB	0,35 ^{ns}	1	
<i>nifH</i>	0,25 ^{ns}	0,47 ^{ns}	1	<i>nifH</i>	0,44 ^{ns}	0,48 ^{ns}	1
pH	0,50 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	pH	0,38 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,5 ^{ns}
NO ₃ ⁻	-0,42 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,50 ^{ns}	NO ₃ ⁻	0,10 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,15 ^{ns}
NH ₄ ⁺	-0,12 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	-0,38 ^{ns}	NH ₄ ⁺	0,27 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,23 ^{ns}
CO	-0,63*	0,23 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	CO	0,08 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,15 ^{ns}
P	-0,47 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,13 ^{ns}	P	-0,12 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,68*
Ca ²⁺	0,26 ^{ns}	0,60*	-0,11 ^{ns}	Ca ²⁺	-0,10 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,00 ^{ns}
Mg ²⁺	0,06 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	Mg ²⁺	0,47 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,08 ^{ns}
K ⁺	0,22 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,19 ^{ns}	K ⁺	0,33 ^{ns}	0,62*	0,49 ^{ns}
Al ³⁺	-0,50 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,03 ^{ns}	Al ³⁺	-0,17 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,01 ^{ns}
H+Al	-0,49 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,08 ^{ns}	H+Al	0,00 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,26 ^{ns}
CTC	-0,01 ^{ns}	0,67*	-0,12 ^{ns}	CTC	0,15 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,39 ^{ns}
Fe	-0,57 ^{ns}	-0,51 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	Fe	-0,04 ^{ns}	-0,36 ^{ns}	0,22 ^{ns}
Mo	0,28 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	Mo	0,21 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	-0,08 ^{ns}

*significativo a 5%; **significativo a 1%; ^{ns} não significativo

APÊNDICE B - Coeficientes de correlação de Spearman (ρ) entre atributos químicos do solo e o número de cópias do 16S rRNA (Bacteria e AOB) e *nifH* na estação úmida

	Braquiária + Gliricídia			Braquiária + Sabiá			
	Bacteria	AOB	<i>nifH</i>	Bacteria	AOB	<i>nifH</i>	
Bacteria	1			Bacteria	1		
AOB	-0,73**	1		AOB	-0,26 ^{ns}	1	
<i>nifH</i>	0,61*	-0,37 ^{ns}	1	<i>nifH</i>	0,62*	-0,25 ^{ns}	
pH	-0,10 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,50 ^{ns}	pH	-0,11 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,37 ^{ns}
NO ₃ ⁻	-0,47 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	NO ₃ ⁻	-0,41 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,18 ^{ns}
NH ₄ ⁺	-0,27 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	NH ₄ ⁺	-0,43 ^{ns}	0,29 ^{ns}	-0,81**
CO	-0,08 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	CO	-0,13 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,22 ^{ns}
P	0,28 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	P	-0,27 ^{ns}	0,18 ^{ns}	-0,41 ^{ns}
Ca ²⁺	0,27 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,51 ^{ns}	Ca ²⁺	0,29 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,54 ^{ns}
Mg ²⁺	0,16 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	0,15 ^{ns}	Mg ²⁺	-0,24 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-0,03 ^{ns}
K ⁺	0,27 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,04 ^{ns}	K ⁺	-0,71**	0,67*	-0,76**
Al ³⁺	-0,42 ^{ns}	0,43 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	Al ³⁺	0,28 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	0,25 ^{ns}
H+Al	-0,32 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	H+Al	0,20 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,34 ^{ns}
CTC	-0,31 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,12 ^{ns}	CTC	0,02 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,13 ^{ns}
Fe	-0,03 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	Fe	0,27 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,18 ^{ns}
Mo	-0,41 ^{ns}	0,54 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	Mo	-0,36 ^{ns}	0,57 ^{ns}	-0,32 ^{ns}

*significativo a 5%; **significativo a 1%; ^{ns} não significativo