

**ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO
SISTEMA SOLO-PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

RAFAEL LUIZ FRINHANI ROCHA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2018**

ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO SISTEMA SOLO-PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RAFAEL LUIZ FRINHANI ROCHA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

062/2018j

R672 Rocha, Rafael Luiz Frinhani.

Atributos químicos e microbiológicos associados ao sistema solo-palha de cana-de-açúcar / Rafael Luiz Frinhani Rocha. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

71 f. : il.

Bibliografia: 44 – 54.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Palha de Cana-de-Açúcar. 2. Ciclagem de Nutrientes. 3. Microbiologia do Solo. 4. Consórcios Microbianos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 633.61

ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO SISTEMA SOLO-PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RAFAEL LUIZ FRINHANI ROCHA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018

Comissão Examinadora:

Prof^a Aline Chaves Intorne (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – IFRJ

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (D.Sc., Ciências do Solo) - UENF

Dr. Willian Pereira (D.Sc., Ciências do Solo) – UFRRJ

Prof. Fabio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) – UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João e Gelsiana,
meus irmãos Rodrigo e Rafaela,
meus cunhados Wilson e Danúbia,
meus sobrinhos Enrico e Gabriel e ao
meu avô Pedro.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo carinho e cuidado a mim dedicados ao longo de toda a minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao professor Fabio Lopes Olivares, pelo voto de confiança, apoio, ensinamentos, pela dedicada orientação e paciência;

Aos técnicos e amigos Bruna, Adriana e Letícia pela grande ajuda durante os experimentos;

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Rezende, ao técnico Thiago Pessanha Rangel e a toda a equipe do Laboratório de Ciências Ambientais/LCA – Uenf pela prestatividade e colaboração;

Aos amigos do LBCT e NUDIBA que direta ou indiretamente ajudaram para a conclusão deste trabalho, tornando mais agradáveis os momentos de estudo.

A todos, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
HIPÓTESE	4
OBJETIVO GERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. A cultura da cana-de-açúcar.....	5
2.2. Produção e potencial nutricional da palha de cana-de-açúcar.....	6
2.3. Microrganismos facilitadores da nutrição da cultura da cana-de-açúcar.....	7
2.4. Consórcios microbianos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Caracterização geral da área de estudo.....	11
3.2. Coleta de solos e estimativa da biomassa da palha.....	12
3.3. Atributos físico-químicos do solo e palha.....	13
3.4. Quantificação e isolamento de microrganismos a partir do solo e palha de cana-de-açúcar.....	14
3.5. Conservação e estocagem de isolados.....	15
3.6. Caracterização funcional dos isolados.....	16
3.6.1. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio.....	16
3.6.2. Avaliação prévia do potencial microbiano na decomposição de	

compostos lignocelulósicos.....	16
3.7. Compatibilização entre isolados fúngicos e bacterianos.....	17
3.8.Quantificação de grupos redutores totais (GRT).....	18
3.8.1. Preparo do meio de cultura e inóculo	18
3.8.2. Preparo do reagente 3-5 dinitrosalicílico (DNS) e leitura da intensidade.. de cor.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Atributos físico-químicos do sistema solo-palha de cana-de-açúcar	21
4.1.1. Biomassa da palha de cana-de-açúcar	21
4.1.2. Conteúdo químico do solo cultivado com cana-de-açúcar e solo de referência.....	22
4.2. Isolamento e estimativa populacional de microrganismos associados ao solo e palha de cana-de-açúcar.....	25
4.3. Potencial microbiano associado à dinâmica nutricional do sistema solo- palha da cana-de-açúcar.....	30
4.3.1. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio.....	30
4.3.2. Avaliação prévia do potencial microbiano na decomposição de compostos lignocelulósicos.....	32
4.4. Compatibilidade entre isolados bacterianos e fúngicos.....	34
4.5. Quantificação de grupos redutores totais (GRT).....	37
5. CONCLUSÕES	43
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICES	55

RESUMO

ROCHA, Rafael Luiz Frinhani Rocha; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2018. ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO SISTEMA SOLO-PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Orientador: Fabio Lopes Olivares.

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas do mundo com grande relevância econômica e socioambiental. Anualmente, grandes quantidades de insumos são aplicados, causando danos ao ambiente e elevando os custos de produção. Com o fim da queima como forma de desfolhagem, toda a palha é aportada sobre o solo, sendo necessária a utilização de manejo adequado para aproveitamento dessa matéria orgânica sem comprometer a produtividade. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial microbiano na dinâmica nutricional do sistema solo-palha de cana-de-açúcar e testar microrganismos na forma de cultura mista na degradação da palha *in vitro*. Também foi avaliada a influência da palha nos atributos químicos do solo. Os microrganismos foram isolados a partir de amostras de solo e palha coletadas em uma área cultivada com cana-de-açúcar no município de Linhares-ES. Após isolamento os microrganismos foram quantificados em diferentes meios de cultivo e isolados a partir de amostras de uma área sob colheita mecanizada no sexto corte, representativas do sistema solo-palha e do solo de referência (sem deposição anual de palha de cana). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao tipo de solo (solo cana e solo de referência) para C, sendo observado apenas diferença em relação à profundidade, com maiores valores para a profundidade 0-5 cm. Essa característica também foi observada para N, P e Ca. Quanto a K, Mg e Na, o solo cana apresentou os maiores valores, assim como a soma de bases e a CTC, indicando influência da palha em tais elementos no solo. Neste estudo foram obtidos um total de 325 isolados, sendo 122 bacterianos e 223 fúngicos. Os isolados bacterianos foram testados para a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, sendo encontrados 28 isolados potencialmente diazotróficos. Tanto os isolados bacterianos e fúngicos foram testados para o potencial de degradação de celulose microcristalina, obtendo um total de 27 isolados positivos para o potencial, sendo 13 bacterianos e 14 fúngicos. A partir destes resultados, foram selecionados doze isolados bacterianos (9,12,13a,42,52,59,77,150,151, 152,

203a e 206l) com base no potencial, características morfológicas e de cultivo e doze isolados fúngicos (42F, 300, 302, 351, 357, 395, 430, 433, 435, 461, 476 e 503), seguindo os mesmos critérios, os quais foram confrontados em ensaios de compatibilidade. Nesses ensaios, apenas os isolados fúngicos 357, 395 e 476 apresentaram alta compatibilidade com todos os isolados bacterianos testados. Os resultados obtidos foram utilizados para avaliar o potencial isolado e combinado de bactérias e fungos na degradação da palha de cana-de-açúcar *in vitro* por meio de ensaios de liberação de grupos redutores totais (GRT). Foram propostas 16 combinações, considerando a compatibilidade previamente testada e resultados de estímulo de crescimento bacteriano observados no mesmo ensaio, onde isolados fúngicos estimularam o crescimento de bactérias, sendo então propostas as combinações: 12x357, 59x357, 77x357, 203ax357, 12x395, 59x395, 77x395, 203ax395, 12x476, 59x476, 77x476, 203ax476, 153x461, 153x435, 150x302, 150x433. As combinações foram inoculadas em meios de cultura contendo palha como fonte exclusiva de carbono (meio I) e suplementação com 0,01% de manitol (meio II), a fim de avaliar o efeito do C-lábil na degradação da palha e crescimento microbiano. Após análises, o isolado 12 apresentou os valores mais elevados para liberação GRT nos meios I e II. A inoculação mista com os isolados 59-395 foi a única que apresentou valores superiores de GRT em relação aos ensaios de culturas puras. No meio I, foi observado que 8 dentre as 16 combinações testadas, demonstraram redução nos valores de GRT, indicando consumo de açúcares. No meio com a adição de manitol, 12 dentre as 16 combinações apresentaram redução nos valores de GRT após 14 dias, indicando consumo do carbono inicialmente adicionado ao meio. Foi observado que a adição de manitol como fonte extra de carbono não resultou em diferenças consideráveis nos valores finais de grupos redutores totais.

Palavras-chave: Palha de cana; Ciclagem de nutrientes; Microbiologia do solo; Consórcios microbianos.

ABSTRACT

ROCHA, Rafael Luiz Frinhani Rocha; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2018. CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ATTRIBUTES ASSOCIATED TO THE SOLO-STRAW SYSTEM OF SUGAR CANA. Advisor: Fabio Lopes Olivares.

Sugar cane is one of the world's major agricultural crops with great economic and socio-environmental relevance. Annually, large quantities of inputs are applied, causing damage to the environment and raising production costs. With the end of the burning as a form of defoliation, all the straw is deposited on the soil, being necessary the use of appropriate management to use this organic matter without compromising the productivity. Thus, the objective of this work was to evaluate the microbial potential in the nutritional dynamics of the sugar-cane soil-straw system and to test microorganisms as a mixed crop in straw degradation in vitro. The influence of straw on soil chemical attributes was also evaluated. The microorganisms were isolated from soil and straw samples collected in an area cultivated with sugar cane in the municipality of Linhares-ES. T5r soil-straw system and reference soil (without annual deposition of cane straw). No significant differences were observed in relation to soil type (cane and reference soil) for C, with only difference in relation to depth, with higher values for 0-5 cm depth. As for K, Mg and Na, the cane soil presented the highest values, as well as the sum of bases and CTC, indicating the influence of straw on such elements in the soil. In this study a total of 325 isolates were obtained, being 122 bacterial and 223 fungal. The bacterial isolates were tested for biological nitrogen fixation capacity and 28 potentially diazotrophic isolates were found. Both bacterial and fungal isolates were tested for potential degradation of microcrystalline cellulose, obtaining a total of 27 positive isolates for the potential, being 13 bacterial and 14 fungal. From these results, twelve bacterial isolates (9,12,13a, 42,52,59,77,150,151, 152, 203a and 206l) were selected based on potential, morphological and culture characteristics and twelve fungal isolates (42F, 300, 302, 351, 357, 395, 430, 433, 435, 461, 476 and 503), following the same criteria, which were confronted in compatibility assays. In these tests, only the fungal isolates 357, 395 and 476 showed high compatibility with all the bacterial isolates

tested. The results obtained were used to evaluate the isolated and combined potential of bacteria and fungi in the degradation of sugar cane straw in vitro by means of the release of total reducing groups (GRT). Sixteen combinations were proposed, considering the compatibility previously tested and bacterial growth stimulus results observed in the same assay, where fungal isolates stimulated the growth of bacteria, and the following combinations were proposed: 12x357, 59x357, 77x357, 203ax357, 12x395, 59x395, 77x395, 203x395, 12x476, 59x476, 77x476, 203ax476, 153x461, 153x435, 150x302, 150x433. Combinations were inoculated in culture media containing straw as the sole source of carbon (medium I) and supplementation with 0.01% mannitol (medium II) in order to evaluate the effect of C-labile on straw degradation and microbial growth. After analysis, isolate 12 had the highest values for GRT release in media I and II. Mixed inoculation with isolates 59-395 was the only one that presented higher values of GRT in relation to the pure cultures assays. In the middle I, it was observed that 8 of the 16 combinations tested, demonstrated a reduction in the values of GRT, indicating consumption of sugars. In the middle with the addition of mannitol, 12 out of the 16 combinations showed a reduction in GRT values after 14 days, indicating carbon consumption initially added to the medium. It was observed that the addition of mannitol as an extra carbon source did not result in significant differences in the final values of total reducing groups.

Keywords: Cane straw; Nutrient cycling; Soil microbiology; Microbial consortia.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das maiores e mais importantes culturas agrícolas do mundo (Misra et al., 2016). O setor sucroenergético, o qual engloba a cadeia produtiva de cana-de-açúcar e de seus derivados, principalmente açúcar e etanol, apresenta grande relevância socioeconômica e ambiental, devido ao PIB gerado e pelas vastas áreas ocupadas pelos plantios. No Brasil, a cultura encontrou condições favoráveis para o seu desenvolvimento e juntamente com incentivos governamentais no setor sucroenergético, o país se destaca no mercado mundial como o maior produtor de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos (Lourenzani & Caldas, 2014).

A área plantada de cana-de-açúcar no Brasil vem crescendo nas últimas décadas, atingindo um total de 9.05 milhões de hectares destinados à atividade sucroenergética na safra 2016/17. A produção ficou estimada em 657,18 milhões de toneladas, movimentando mais de R\$ 74,2 bilhões na safra 2016/17 (MAPA, 2017; CONAB, 2017). O crescimento do setor sucroenergético se deu em razão da evidente insustentabilidade ambiental da exploração e produção do petróleo e de seus derivados. A cana-de-açúcar se apresenta como uma das mais promissoras culturas para produção de bicompostíveis e o etanol é considerado a alternativa mais viável para independência da matriz energética do petróleo (Megda et al., 2012). Além disso, apresenta equilíbrio altamente positivo de energia e gases de efeito estufa (Irena, 2014; Chagas et al., 2016).

A expansão e modernização do setor sucroenergético fez com que a cultura canavieira passasse por uma adequação à realidade ambiental. Visando reduzir a emissão de CO₂ e de partículas sólidas na atmosfera, medidas como a proibição gradativa da queima no estágio pré-colheita foram adotadas, principalmente no Estado de São Paulo, pela Lei nº 11.241/2002 (Megda et al., 2012). Desta forma, a gestão verde da cana-de-açúcar inclui a deposição de grandes quantidades de palha no solo, principalmente após a colheita, variando de 7 a 30 toneladas de matéria seca por hectare, com valores que podem oscilar em razão da variedade e idade do canavial (Leal et al., 2013; Segnini et al., 2013; Campos et al., 2010).

Devido à composição química rica em polímeros lignocelulósicos, a palha de cana-de-açúcar tem despertado o interesse na produção de etanol de segunda geração, agregando valor à cultura (Silva et al., 2010). A conversão da cana-de-açúcar em bioenergia corresponde atualmente à segunda principal matriz energética do país e somada ao açúcar e ao etanol, colocam a cana-de-açúcar entre as principais culturas agrícolas em valor de produção no agronegócio brasileiro (Portz et al., 2011; Brasil, 2017) Khatiwada et al., 2016; Neves & Trombin, 2014).

Para viabilizar o aumento da produtividade e suprir o mercado, altas quantidades de fertilizantes são aplicadas por ano nos plantios de cana-de-açúcar. Atualmente, a cana-de-açúcar consome por ano mais de 4 milhões de toneladas de fertilizantes, o que corresponde a cerca de 14% do total movimentado em vendas no país, sendo enquadrada como a terceira cultura de maior demanda de fertilizantes sintéticos no país (ANDA, 2010; Pereira, 2017).

A manutenção da palha no solo também apresenta problemas agrônômicos, como baixo aproveitamento de fertilizantes nitrogenados, falha na brotação, propagação de fungos patogênicos e emergência de infestações de pragas e doenças (Costa et al., 2003; Campos et al., 2010). Apesar desses problemas a palha é capaz de proteger o solo da perda de água e da erosão, representando ainda um estoque de nutrientes, resultando na melhoria dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo (Oliveira et al., 1999; Mendoza et al., 2000; Andreotti et al., 2015).

A microbiota do solo desempenha papel importante em relação à manutenção da palha no pós-colheita, sendo responsável pelos processos de

decomposição e mineralização de nutrientes da palha (Moreira & Malavolta, 2004). A atividade microbiana é condicionada por fatores como temperatura, umidade, aeração e a composição química da palha (Yamaguchi, 2015). Normalmente a decomposição ocorre de forma lenta em função da alta relação C/N e da recalcitrância dos componentes lignocelulósicos da palha (Lynch, 1986; Rossetto et al., 2013).

A atividade microbiana vem sendo abordada na decomposição da biomassa lignocelulósica (Rodrigues et al., 2017). Alguns trabalhos apontam a utilização de consórcios microbianos como uma alternativa promissora capaz de aperfeiçoar o potencial de diferentes espécies de microrganismos com atributos fisiológicos diversos, resultando em complementação metabólica e maior resistência e condições ambientais adversas (Lee et al., 2013).

Apesar do conhecimento sobre a atividade microbiana na decomposição, estudos relacionados ao tratamento microbiológico de palha de cana-de-açúcar ainda são incipientes. Nesse contexto, o núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura/Nudiba-UENF tem trabalhado na busca por tecnologias que permitam aumentar a eficiência do uso de insumos biológicos em diversos processos e culturas agrícolas e estabeleceu uma parceria de colaboração científica com pesquisadores da Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio no Japão, a fim de investigar estratégias alternativas no tratamento da palha de cana-de-açúcar e na melhoria da fertilidade dos solos cultivados.

No intuito de fornecer subsídios científicos e biotecnológicos, no presente estudo foi testado o potencial microbiano associado à fixação biológica de nitrogênio e decomposição de palha de cana-de-açúcar na forma de culturas puras e em formulações consorciadas com fungos e bactérias voltados para o tratamento da palha *in vitro*. Foi realizada ainda a caracterização química do solo.

Hipótese

Fungos e bactérias podem agir sinergicamente para acelerar a decomposição da palha de cana-de-açúcar e, juntamente com bactérias diazotróficas podem promover incrementos nas taxas de liberação de nutrientes nos solos, colaborando para a nutrição da planta.

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de microrganismos associados à dinâmica nutricional (decomposição da palha e fixação biológica de nitrogênio) do sistema solo-palha de cana-de-açúcar como alternativa para o tratamento desses resíduos e enriquecimento nutricional dos solos da cultura canavieira.

Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização física e química do solo cultivado com cana-de-açúcar e solo de referência sem influência direta da palha;
- Isolar bactérias e fungos a partir de solo e palha de cana-de-açúcar;
- Avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio dos isolados bacterianos;
- Investigar o potencial de produção de enzimas lignocelulósicas pelos isolados;
- Testar a compatibilização entre isolados diazotróficos e potencialmente produtores de enzimas lignocelulósicas;
- Propor combinações entre microrganismos eficientes na degradação da palha de cana-de-açúcar *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*) é uma gramínea pertencente à família *Poaceae* originária do sudeste asiático e de ciclo semiperene (Doorrembos & Kassam, 1979). Devido ao seu metabolismo C4, a cana-de-açúcar possui alta eficiência fotossintética com ampla capacidade adaptativa, sendo produzida em regiões com variadas características edafoclimáticas, obtendo índices de produção mais expressivos nas regiões tropicais e subtropicais (Hussain et al., 2004).

Introduzida inicialmente na região nordeste ainda no período colonial, a cultura canavieira se expandiu para todas as regiões do Brasil. Atualmente, os principais polos produtores estão situados nas regiões Sudeste, Nordeste e Sul (Abreu, et al., 2011). No cenário nacional, destaca-se ainda o estado de São Paulo, o maior produtor do país, produzindo cerca de 63% da produção nacional (Conab (2016)).

Devido à tradição da cultura e aos altos investimentos em modernização e melhoramento genético, o setor sucroenergético é de grande importância para a economia brasileira, em termos de participação no produto interno bruto (PIB), geração de emprego e inserção no cenário internacional. Atualmente o Brasil se destaca como o maior produtor de cana-de-açúcar, ocupando ainda o lugar de maior exportador de açúcar do mundo (MAPA, 2017; CONAB, 2017).

Segundo Rosseto e Santiago (2016), no Brasil é possível realizar plantios de cana-de-açúcar em duas épocas/sistemas diferentes: sistema de ano (12 meses) e sistema de ano-e-meio (18 meses). No primeiro sistema, a cana-de-ano é plantada entre os meses de setembro e outubro, com colheita ideal a partir de novembro. No segundo sistema, a cana-de-açúcar é plantada entre os meses de janeiro e março, com colheita ideal entre 16 e 18 meses após o plantio.

Em função de suas características e do manejo empregado, a cana-de-açúcar é mantida no campo por cortes sucessivos, com aplicação de altas dosagens de insumos nos intervalos entre os cortes (Pupin, 2008). Assim, a cada ano toneladas de fertilizantes são lançadas no solo, provocando contaminação do solo e corpos hídricos (Troeh & Thompson, 2007). A cultura da cana-de-açúcar consome anualmente cerca de 15% do total de fertilizantes utilizados no Brasil, o que corresponde à cerca de 43% do custo total de produção (Otto et al., 2010; SOCICANA, 2015). Nesse contexto, o manejo da palha em campo surge como alternativa no uso racional de fertilizantes, conciliando redução de custos e sustentabilidade ambiental.

2.2. Produção e Potencial Nutricional da Palha de Cana-de-açúcar

Altos investimentos no setor sucroenergético e a busca por uma cadeia produtiva sustentável vêm substituindo a queima da cana-de-açúcar pela colheita mecanizada (Cavaliere et al., 2001). As principais críticas sobre o uso da queima estão relacionadas às emissões de poluentes atmosféricos que contribuem com a intensificação do efeito estufa (Moreira, 2013; Souza et al., 2005). A queima também causa danos como compactação e erosão dos solos, redução da matéria orgânica e empobrecimento da biota e microbiota associada ao solo (Guarnieri & Jannuzzi, 1992; Rosseto, 2004; Paixão & Fonseca, 2011). A colheita mecanizada resulta no aporte e manutenção de grandes volumes de resíduos culturais sobre o solo (Campos, 2003), podendo alcançar 30 toneladas por hectare (Hassuani, 2005).

A fim de obter melhor aproveitamento da palha, diversas alternativas vêm sendo propostas, como a exploração do potencial da palha na cogeração de energia e na produção de etanol de segunda geração (Silva et al., 2016; Leal et al., 2013). No entanto, a utilização da palha na cobertura do solo se destaca

contribuindo diretamente com a cultura, com melhoras na fertilidade, agregação e estruturação dos solos (Carvalho et al., 2010), reduzindo ainda custos com a remoção da palha (Rachid et al., 2012).

A manutenção da palha também favorece a atividade microbiana do solo, devido à conservação da umidade e às menores flutuações térmicas (Moitinho et al., 2013). Aliada ao manejo correto, a atividade microbiana pode contribuir para aumento da fertilidade dos solos (Souza, et al., 2005; IAC, 2007). Em um estudo quantificando os teores de macronutrientes estocados na palha de cana-de-açúcar, Oliveira (1999) encontrou valores de 10,9 kg ha⁻¹, 2,6 kg ha⁻¹, 64,6 kg ha⁻¹, 27,5 kg ha⁻¹, 12,8 kg ha⁻¹, 9 kg ha⁻¹ para N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, com teores médios de carbono variando entre 390 a 450 g kg ha⁻¹ (Trivelin et al., 1996).

Os processos de mineralização da palha e disponibilização dos nutrientes ao solo são condicionados por fatores edafoclimáticos e pela composição química da palha, como relação C/N, teores de lignina, celulose, hemicelulose e polifenóis (NG Kee Kwong et al., 1987; Selle, G. L., 2007). Relação C/N < 20:1 apresentam maiores taxas de decomposição, e mineralização é mais acelerada (Coelho, 2012), assim como relações C/N próximas a 100:1 retardam a decomposição e a mineralização (Melillo et al., 1982). Em alguns estudos levantados por Ramos et al. (2016), foi observado que em média 60% da palha é decomposta durante o período de um ciclo de colheita (12-18 meses), restando após este período o material mais recalcitrante.

2.3. Microrganismos facilitadores da nutrição de cana-de-açúcar

Nas últimas décadas, diversas pesquisas se voltaram para o potencial de microrganismos como fungos e bactérias na promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas (Berg, 2009). O interesse nesses estudos surgiu em meio à percepção do eminente esgotamento das reservas de petróleo e a preocupação quanto aos impactos ambientais causados pela agricultura convencional e pela indústria. Neste contexto, a importância do desenvolvimento de novas tecnologias e a utilização de microrganismos benéficos à agricultura se apresentam como alternativas eficientes, sustentáveis e financeiramente viáveis (Khan et al., 2007).

Para a agricultura, os microrganismos considerados benéficos são aqueles capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, decompor resíduos culturais favorecendo a ciclagem de nutrientes, os que suprimem doenças de plantas e patógenos transmitidos pelo solo, os que produzem compostos bioativos como hormônios e os solubilizadores de fosfatos (Okon & Vanderleyden, 1997; Singh et al., 2011; Chen et al., 2006).

Na cultura da cana-de-açúcar, grandes quantidades de nitrogênio são demandadas anualmente, via fertilização artificial. Entretanto, alguns microrganismos são capazes de contribuir para a fertilidade do solo e das culturas por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Nesse processo, as bactérias fixadoras colonizam as raízes e outros tecidos vegetais sem causar malefícios às plantas (Souza, 2015). O metabolismo dessas bactérias produz um complexo enzimático denominado nitrogenase que atua na redução do N atmosférico em amônio assimilável pelas plantas (Vitousek et al., 2013)

Na cana-de-açúcar, a entrada de nitrogênio pela FBN é economicamente importante (Urquiaga et al., 1992; Taulé et al., 2012). De acordo com Herridge et al (2008), a contribuição média é de 40 kg N.ha⁻¹, correspondendo a cerca de 20% do total de nitrogênio assimilado pela planta. Porém, alguns estudos observaram contribuição ainda maior, com média acima de 30% para o nitrogênio fixado via FBN na cana-de-açúcar (Polidoro et al., 2001).

Além da FBNI, os microrganismos também apresentam papel importante na mineralização da matéria orgânica (Trivelin et al., 2002) e na solubilização de fosfatos (Massenssini et al., 2015) favorecendo a liberação dos nutrientes ao solo, e a assimilação destes pelas raízes das plantas.

Os microrganismos que apresentam essas características são à base de alguns produtos comerciais, denominados bioinoculantes, formulados com microrganismos que promovem o crescimento vegetal por meio de mecanismos diversos, reduzindo custos de produção principalmente pelo aumento do suprimento de nutrientes (Vessey, 2003; Hungria et al., 2010). Um exemplo promissor são os inoculantes à base de *Azospirillum*, que já tiveram sua eficiência comprovada, e seu uso foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA para as culturas de milho e trigo (Silva, 2014).

2.4. Consórcios microbianos

A microbiota do solo é responsável por desempenhar diversos processos que ocorrem simultaneamente e com interações entre diferentes espécies. A atividade conjunta destes microrganismos possibilita maior eficiência na execução de funções com alto grau de complexidade em relação a populações individuais, além de serem mais robustos e adaptáveis às flutuações ambientais (Brenner et al., 2008). A eficácia dessas interações é favorecida pelo sinergismo metabólico e pela comunicação entre os membros da comunidade microbiana, onde cada microrganismo desempenha atividade específica (Sacco, 2013).

Os consórcios possibilitam a otimização dos processos biológicos desempenhados pelos microrganismos. Diversos estudos abordam o uso de consórcios microbianos, remontando o conceito de comunidade microbiana para fins ambientais, industriais e agrícolas (Márquez-Rocha et al., 2001; Raja et al., 2006; Wongwilaiwalin et al., 2010).

No setor sucroenergético, há grande interesse pelo uso de consórcios microbianos na degradação de polímeros lignocelulósicos na dinâmica de nutrientes e na produção de etanol de segunda geração (Lima et al., 2014; Avira et al., 2010). Na natureza, a decomposição destes polímeros é realizada por diversos microrganismos, inclusive não-lignocelulósicos, de forma a incorporar a diversidade metabólica ao processo (Haruta et al., 2002). Essa diversidade propicia melhores resultados, visto que algumas bactérias são menos eficientes na degradação em relação aos fungos, contudo, utilizam frações intermediárias da degradação destes compostos, complementando a ação fúngica e reduzindo a carga metabólica de uma única espécie (Møller et al., 1999; Jia et al., 2016).

Em laboratório, uma das principais dificuldades em se estabelecer um consórcio microbiano eficiente na degradação de polímeros de lignocelulose é o equilíbrio metabólico dos microrganismos utilizados, de forma que não haja comprometimento na atividade metabólica e enzimática entre os microrganismos (Brenner et al., 2008; Zaldivar et al., 2001). Diante desse pressuposto, ensaios microbiológicos com abordagens sobre consórcios microbianos se mostram necessários e aplicáveis em escala industrial e agrícola.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização geral da área de estudo

As amostras de palha de cana-de-açúcar juntamente com as amostras de solo foram coletadas em uma área cedida pela Linhares Agroindustrial S.A. (LASA), empresa instalada no município de Linhares, no norte do estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil (Figura 1). A coleta foi realizada em maio de 2016.

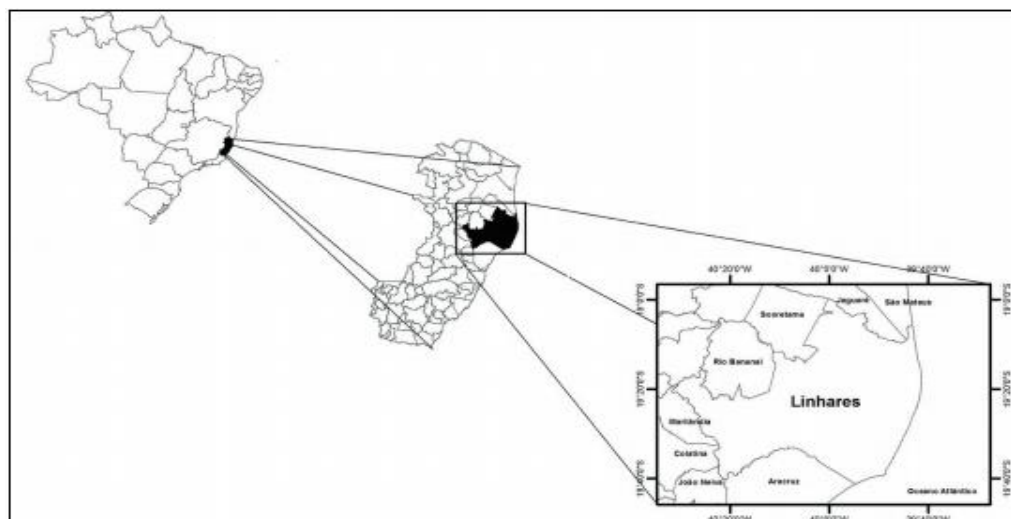


Figura 1. Localização do município de Linhares – ES. Souza, 2015 (Adaptado).

De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, com verão quente e úmido e inverno seco. A temperatura média anual é de 23,5

°C e precipitação média anual de 1291 mm (Álvares et al., 2013). Os dados climáticos referentes ao período de coleta estão apresentados na figura 2.

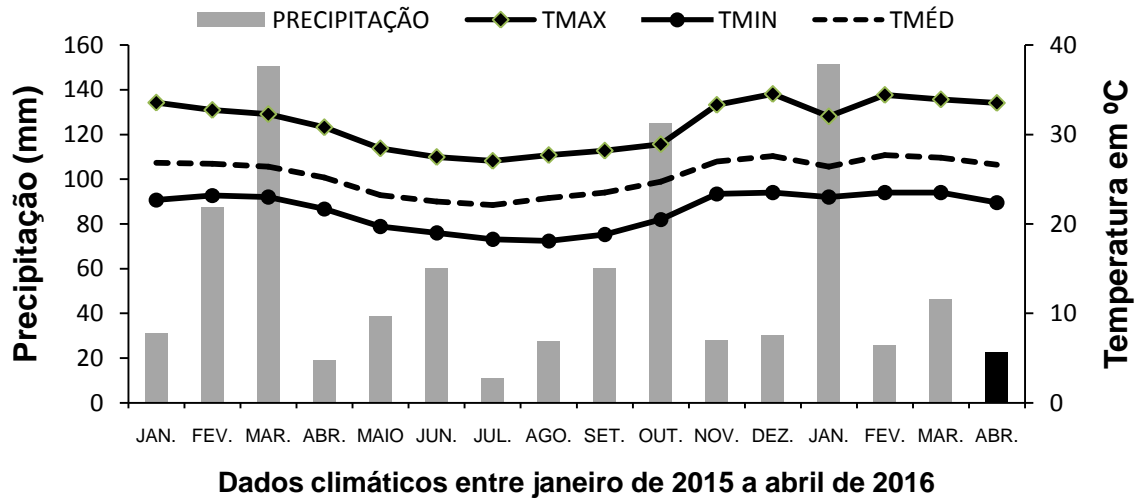


Figura 2. Dados climáticos sobre a área de estudo no período anterior à coleta. Em destaque abril, mês anterior à coleta.

Geograficamente, o município de Linhares faz parte da zona denominada Baixo Rio Doce. É característica da região a ocorrência de extensas áreas de relevo suave ondulado, onde uma série de baixos platôs compõe o chamado relevo tubuliforme, com declives próximos ou abaixo de 3% (Tavares et al., 2010). A área de coleta representa um talhão de 11,46 ha (talhão 17) plantada com a variedade RB 867515 no espaçamento entre linhas de 1,4 m com data de plantio inicial em 05/07/2010 (6º corte) e último corte em 27/05/15. A adubação de soqueira foi 15-00-15 (NPK) e aplicação de vinhaça em duas lâminas de 20 mm.

3.2. Coleta de solos e estimativa da biomassa

O solo da área classificado como Latossolo amarelo foi coletado em duas profundidades sob o plantio de cana-de-açúcar, 0–5 cm (S1) e 5-10 cm (S2), constituindo um transecto vertical com duas camadas e amostragem em cinco pontos (AM1, AM2, AM3, AM4 e AM5). Para comparação, foram colhidas também amostras de solo em uma área adjacente sem a interferência da cobertura da

palha de cana-de-açúcar, designados de solo referência, sendo SR1 para a camada 0-5 cm e SR2 para a camada 5-10 cm de profundidade.

Foram colhidas ainda, amostras referenciadas da palha de cana-de-açúcar em dois estágios de decomposição: palha recém-depositada por ocasião da colheita mecanizada (L1), e palha em estágio intermediário-avançado de decomposição (L2). Ambas as subamostras de palha foram coletadas utilizando-se o método de gabarito (Figura 3) com dimensões de 0,30 x 0,30 x 0,10m segundo orientações de Scoriza et al (2012).



Figura 3. Gabarito para coleta de serapilheira em campo e para estimativa da biomassa.

O material coletado em campo foi conduzido ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense NUDIBA-UENF em sacos plásticos e triados para análises.

3.3. Atributos físico-químicos do solo e palha da área de estudo

Em laboratório, o material foi transferido para sacos de papel e triado em frações para análises. Para análise de pH das amostras de solo, foi utilizado pHmetro Digimed DM-22. A análise granulométrica do solo foi realizada no polo de pesquisa em cana-de-açúcar da UFRRJ em Campos dos Goytacazes - RJ segundo o método de dispersão total (EMBRAPA, 1997).

Para análise do teor de umidade do solo, o material foi alocado em sacos de papel Kraft e pesado em balança analítica. Em seguida foi levado à estufa de circulação forçada de ar pelo período de 72 horas e em seguida, encontrando

assim o valor de massa seca e a umidade foi obtida pela diferença entre massa seca e massa úmida.

Para as análises químicas, o material foi fracionado e transferido para sacos de papel e identificados segundo origem das amostras. Em seguida, estes foram encaminhados ao Laboratório de Solos da UFRRJ em Campos dos Goytacazes - RJ para análises de conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S), conteúdo de carbono, nitrogênio e relação C/N, seguindo os procedimentos padronizados com extrator Carolina do Norte.

Os resultados foram submetidos à análise da variância com aplicação do teste F, e as médias comparadas com o software SAEG pelo teste de Tukey a 5%.

3.4. Quantificação e isolamento de microrganismos a partir do solo e palha de cana-de-açúcar

A quantificação e o isolamento dos fungos e bactérias foram realizados no Laboratório de Biologia celular e Tecidual e no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

A fim de se quantificar as populações e obter isolados microbianos, o método de diluição seriada foi utilizado como forma de facilitar o isolamento e cultivo de microrganismos. Os procedimentos seguiram a partir da diluição do material coletado em campo na área de estudo, a saber: Solo cultivado com cana-de-açúcar (S1/S2) e solo adjacente sem cultivo de cana-de-açúcar para referência (SR1/SR2). Ambas as diluições foram realizadas com as duas profundidades amostradas, superficial de 0-5 cm e inferior de 5-10 cm. Para tal, 10g das amostras de solo (AM2, AM3 e AM4) foram pesadas em balança analítica e transferidas para erlemeyer de vidro contendo 90 mL de solução salina ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$). Para as diferentes amostras de palha, recém-descída pela colheita (L1) e palha em decomposição (L2), foi pesado 1g de palha e transferido para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$). A diluição seriada foi utilizada nas subamostras de todos os 5 (cinco) pontos de coleta.

Após a diluição inicial (10^{-1}), os frascos contendo as diluições de solo e palha trituradas com pistilo e gral foram alocados em agitador orbital a 150 rpm

por 30 minutos. Em seguida, 1 ml das diluições foi transferido para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina de mesma concentração com pipetas manuais, e alíquotas de 1mL foram transferidas para novos tubos de ensaios, obtendo assim diluições de 10^{-2} a 10^{-6} . Contudo, para as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC por grama de solo ou palha) foram utilizadas as diluições de 10^{-4} a 10^{-6} .

A partir das diluições de 10^{-4} e 10^{-6} , alíquotas de 100 μ L das diferentes amostras diluídas foram semeadas no centro de placas de Petri contendo diferentes formulações de meios sólidos seletivos e específicos visando ampliar a diversidade de microrganismos isolados: meio BDA (Meio de batata dextrose ágar) para fungos e bactérias, meio BDA suplementado com antibiótico streptomina (400 ppm) (para cultivo de fungos), meio NB (Nutrient Broth) para bactérias e fungos, meio NB suplementado com antifúngico ciclohexamina (50 ppm) para isolamento de bactérias, e meios com carboximetilcelulose (CMCm 0,1 g Kg⁻¹) com composição: NaNO₃: 3,0 g.L-1; K₂ HPO₄ : 1,0 g.L-1; MgSO₄ : 0,5 g.L-1; KCl: 0,5 g.L-1; FeSO₄ .7H₂ O: 10,0 mg.L-1; CMC: 10,0 g.L-1; ágar: 20,0 g.L-1, ou ácido húmico (Meio AH) como fontes exclusivas de carbono cuja composição consiste em: ácido húmico (25 mg C L-1); K₂HPO₄ (0,6 g L-1); KH₂PO₄ (1,8 g L-1); MgSO₄.7H₂O (0,2 g L-1); NaCl (0,1 g L-1); CaCl₂.2H₂O (0,02 g L-1); FeEDTA (solução 1,64%) (4 ml L-1); solução de micronutrientes (2 ml L-1); solução vitaminas (1 ml L-1); 20 mg de extrato de levedura; 15 g L-1 de ágar; pH 6,5..

3.5. Conservação e estocagem de isolados

Após a contagem, colônias de bactérias e fungos de diferentes amostras com aparências distintas foram repicadas para novo meio sólido de mesma composição para verificação da pureza. Esta prática foi mantida até a purificação das culturas.

As placas contendo culturas puras foram fotografadas com câmera fotográfica Canon (ver modelo) sob a luz de um contador de colônias e lâminas foram preparadas para descrição da morfologia celular ao microscópio óptico de contraste de fase Zeiss (ver modelo) acoplado com câmera digital Zeiss Axiocam5. Todos os isolados bacterianos foram fotodocumentados quanto às

características de colônia e estrutura celular. Os isolados fúngicos tiveram apenas as características morfológicas das colônias fotodocumentadas.

Obtidas as culturas puras, todos os isolados foram repicados em frascos de penicilina contendo 5mL de meio NB sólido inclinado para bactérias e 5 mL de meio sólido BDA inclinado para fungos. Após 24h de crescimento, os microrganismos foram cobertos com óleo mineral autoclavado. Os isolados armazenados constituíram o acervo microbiano para o desenvolvimento do trabalho.

3.6. Caracterização funcional dos isolados

3.6.1. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio

A avaliação do potencial diazotrófico dos isolados bacterianos foi realizada a partir da inoculação de 20 µL do inóculo bacteriano previamente preparado, em frascos de penicilina contendo 5 ml de meio JNFB semissólido livre de nitrogênio (Döbereiner et al., 1995). Para 1L, formulação do meio consiste em: 5 g de Ácido Málico, 6 ml de Solução K_2HPO_4 (sol. de 10%), 18 ml de solução KH_2PO_4 (sol. de 10%), 2 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 ml de Solução de NaCl (sol. de 10%), 2 ml de Solução de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (sol. de 1%), 2 ml de solução de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH), 2 ml de Solução de Micronutrientes, 4 ml de Solução de FeEDTA (sol. de 1,64%), 4,5 g de KOH, 1 ml de solução de vitamina e 1,9 g de ágar que deve ser dissolvido antes da distribuição. Ajustando valor final para 1L adicionando água destilada. Ajustar pH entre 5,8-6,2 usando solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 em 5%.

Após a inoculação, os frascos de penicilina foram incubados em câmara B.O.D a 30°C por 7 dias para crescimento. Decorrido este período, os frascos foram retirados e foi observada a formação de uma película aerotóxica na superfície do meio. Para confirmação do resultado obtido, os isolados positivos para esse ensaio, foram repicados três vezes em novos frascos de penicilina contendo meio JNFB e observada novamente a formação da película.

Todos os isolados em que foi observada a formação de película aerotóxica, foram repicados em placas de Petri, purificados e estocados em meio inclinado.

3.6.2. Avaliação prévia do potencial microbiano na decomposição de compostos lignocelulósicos

A produção de enzimas de degradação de parede celular foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), aplicando-se modificações no meio de cultivo e adaptações laboratoriais. Foi elaborado um meio de cultivo com a seguinte composição em 1 L: 2 g de resíduo de palha de cana-de-açúcar peneirado a 1,19 mm, 16 g de ágar, pH 6,0. Os isolados foram inoculados, em quadriplicata, na forma de *spots* nesse meio de cultivo contido em placas de Petri. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 30 °C por 10 dias. Após este período, foi avaliada a atividade de degradação da palha de cana pela observação da presença de halo de crescimento avermelhado.

3.7. Compatibilização entre isolados bacterianos e fúngicos

Os ensaios de compatibilidade entre isolados bacterianos e fúngicos foram realizados segundo a metodologia de Cuesta et al. (2010) com modificações descritas por Jesus (2013). Os isolados selecionados foram previamente caracterizados quanto ao fenótipo da colônia e estrutura celular para bactérias (Apêndice 1) e quanto à cor e textura para fungos (Apêndice 2). A partir dos estoques com culturas puras os isolados foram cultivados para o ensaio. Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmara BOD a 30°C por 10 dias. Em paralelo, os isolados bacterianos foram crescidos em meio DYG'S líquido (Döbereiner et al., 1995) em shaker a 30°C por 24 horas.

Após crescimento de ambos os microrganismos, discos micelianos dos isolados fúngicos foram inoculados no centro de novas placas de Petri contendo 15 mL de meio NB sólido, enquanto alíquotas de 20 µL do inóculo bacteriano foram aplicadas em pontos equidistantes ao fungo orientado em quatro quadrantes.

As placas contendo os cocultivos foram incubadas em câmara de crescimento a 30°C. O experimento foi avaliado diariamente durante 7 dias e a compatibilidade entre os isolados foi observada verificando-se a presença ou

ausência de halo de inibição de crescimento e grau de contato entre as colônias de bactérias e as hifas fúngicas.

3.8. Quantificação de grupos redutores totais (GRT)

3.8.1. Preparo do meio de cultura e inóculo

Os inóculos foram preparados a partir dos microrganismos purificados e estocados em meio sólido inclinado. Os microrganismos foram crescidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio NB (Nutrient Broth) líquido. Após semente nos tubos, estes foram incubados em agitador orbital a 30°C e 150 rpm para crescimento. O tempo de incubação foi de 24 horas para bactérias e 72 horas para fungos, as quais atingiram densidade celular aproximada de 10^8 células. mL⁻¹ para bactérias e 10^5 esporos fúngicos. mL⁻¹.

Após crescimento, alíquotas 20 µL dos inóculos foram adicionadas a dois meios de cultura (Meio I e Meio II) previamente elaborados com a seguinte formulação: 1g/L de palha de cana-de-açúcar moída, 1g/L NH₄Cl, 5 mL/L de K₂HPO₄ (solução estoque de 10%), 2mL/L de MgSO₄.7H₂O (checar a concentração do estoque), 1 mL/L de NaCl, 2 mL/L de CaCl₂.2H₂O, 4 mL/L de FeEDTA e 1 mL/L de vitaminas. Ao meio II, além dos ingredientes do meio I, foi adicionado 0,01% de Manitol como fonte extra de carbono a fim de comparar os efeitos dessa adição no crescimento microbiano.

3.8.2. Preparo reagente 3-5 dinitrosalicílico (DNS) e leitura da intensidade de cor.

As concentrações de açúcares redutores em solução foram determinadas com uso do método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) e alterações propostas por Vasconcelos et al (2013) e demais ajustes realizados durante o desenvolvimento do experimento.

O método consiste na utilização do reagente, preparado a partir de 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico adicionados a 200 mL de uma solução 2 M de hidróxido de sódio previamente preparada. Em tempo, uma segunda solução contendo 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio foi preparada, sendo dissolvida em 500 mL de água destilada, sobre base de aquecimento e agitação constante. Em seguida, a primeira solução foi adicionada sobre a segunda até completa dissolução do DNS, formando uma solução homogênea. Após o resfriamento, a mistura foi ajustada para o volume de 1L com água destilada. O reagente foi armazenado em frasco de polipropileno identificado e ao abrigo da luz segundo a metodologia.

Para utilização do método foi preparada uma solução inicial de glicose e gerada uma curva analítica. Para tal solução, foi pesado e transferido 1,0 g de glicose anidra para balão volumétrico, aferindo o volume final para 1,0 L com água destilada. A partir dessa solução, diluições foram preparadas com concentrações de 0,1 g/L a 0,9 g/L de glicose. Após preparo, alíquotas de 200 µl de cada solução, incluindo a solução inicial de 1,0 g/L e amostra de calibração (branco) contendo apenas DNS, foram transferidas para microplacas de 96 poços e mensurada a absorbância a 540nm usando leitor de *ELISA* (Hidex Chameleon) e software acoplado (MicroWin 2000). Com os dados obtidos foi obtida a curva padrão.

Para o desenvolvimento do experimento com bactérias, fungos e consórcios de bactérias + fungos, alíquotas de 0,5mL de cada amostra inoculada foram adicionadas a 0,5 mL de DNS em tubos de ensaios. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e os tubos levados para o banho-maria com água em ebulição (100 °C) por 15 minutos. Ao fim desse tempo, a reação foi interrompida com a imersão dos tubos em gelo. A mistura foi então diluída em 4 mL de água, e após diluição, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA a 540 nm, fazendo leitura também da amostra de calibração (branco). Neste caso, a amostra de calibração consistiu no meio sem inoculação e seus valores de absorbância foram descontados do valor total de cada parcela.

O experimento foi conduzido com triplicatas e a concentração de grupos redutores totais (GRT) expressa em g.L^{-1} foi obtida segundo a equação:

$$GRT = abs \times f \times d \quad (Eq. 1)$$

Em que:

abs é média das absorbâncias lidas;

f é fator de concentração;

d é inverso da diluição da amostra.

A leitura da intensidade da cor foi feita em 7 e 14 dias após a inoculação e as médias dos tratamentos foram comparadas com o software *SAEG* pelo teste *Skott-Knott* em nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atributos físico-químicos do sistema solo-palha de cana-de-açúcar

4.1.1. Biomassa da palha de cana-de-açúcar

A estimativa da quantidade total de palhada de cana-de-açúcar depositada sobre o solo foi de $8,98 \pm 1,89 \text{ t ha}^{-1}$, valor que corresponde às deposições anteriores e à recém-depositada pela colheita mecanizada realizada em maio de 2016. Diversos estudos abordam a deposição de palha sobre o solo cultivado com cana-de-açúcar, e relatam valores entre 7 t ha^{-1} a 20 t ha^{-1} ano (Campos, 2003; Robertson & Thorburn, 2007; Oliveira et al., 2016), com valores médios acima de 10 t ha^{-1} ano (Schultz, 2010).

Os valores observados ligeiramente abaixo daqueles comumente encontrados para a produção de palha podem ser justificados pela variedade cultivada, assim como pelo manejo empregado e principalmente pelas condições ambientais (clima e solo) as quais o canavial é submetido (Marchiori, 2004). A essa última pode ser atribuída maior contribuição nos valores de produtividade da biomassa da palha na área de estudo, visto que as condições climáticas observadas foram atípicas, com menores precipitações e temperaturas mais elevadas em relação à série histórica para a região (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura e precipitação do período de influência sobre a coleta e da série histórica para a região da Usina Lasa em Linhares - ES.

Atributos	Período de Coleta*	Média da Séries Histórica **
Temperatura (°C)	Mínima	21,5
	Média	25,4
	Máxima	31,1
Precipitação anual (mm)	Média	913,2
		1271

* Período de influência sobre a coleta: Janeiro/2015 – Abril/2016. ** Séries históricas de 1984 a 2014.

4.1.2. Conteúdo químico do solo cultivado com cana-de-açúcar e solo de referência

Os maiores teores de carbono foram encontrados na profundidade 0-5 cm, sem diferenças significativas entre as condições de solo (Tabela 3).

Tipo de Solo ⁽¹⁾	Prof. ⁽²⁾	pH ⁽³⁾	Complexo Sortivo										N	C	C/N	P	K	S
			Ca	Mg	Na	SB ⁽⁴⁾	Al	H+Al	T ⁽⁵⁾	t ⁽⁶⁾	V ⁽⁷⁾	% Total						
Solo	SC1 0-5 cm	5,34a	0,54a	0,50a	0,07a	1,66a	0,30b	4,12a	5,78a	1,96a	28,56a	0,17ab	1,47a	9,53a	22,40a	209,60a	15,70b	
Cana	SC2 5-10 cm	5,16a	0,20b	0,20bc	0,06ab	0,66b	0,56b	3,88a	4,74b	1,42b	18,12b	0,11b	0,98b	9,12ab	11,20b	158,20b	14,30b	
Solo	SR1 0-5 cm	4,60b	0,50a	0,30b	0,03c	1,00b	0,60b	4,30a	5,30ab	1,60ab	19,10b	0,24a	1,30a	5,43b	12,00b	69,00c	19,30b	
Referência	SR2 5-10 cm	4,30b	0,20b	0,10c	0,04bc	0,54b	1,00a	4,20a	4,69b	1,50b	9,90c	0,14b	0,91b	6,69ab	7,60b	48,00c	31,40a	
C.V. (%)		4,79	31,97	35,99	24,78	26,02	27,90	6,46	7,10	14,14	10,97	23,89	11,88	28,16	31,18	10,89	18,06	

Médias seguidas das mesmas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em 5%; (1) Tipo de solo: solo cana e solo referência; (2) Prof.: profundidade; (3) pH em H₂O; (4) SB: soma de bases; (5) T: CTC a pH 7,0; (6) t: CTC efetiva; (7) V: saturação por bases.

A esse resultado, pode se atribuir o aporte direto de matéria orgânica proveniente da palha de cana e da serrapilheira da vegetação nativa no solo cana e no solo de referência, respectivamente. De acordo com Yamaguchi (2015), a palha depositada contribui para o aumento nos teores de carbono no solo, principalmente em camadas superficiais, contudo, não foi observada diferença significativa nos teores de carbono em função do depósito de palha.

Os teores de nitrogênio também não apresentaram grande variação em função do tipo de solo, apresentando diferença significativa apenas em relação à profundidade, com valores mais elevados na camada 0-5 cm. Destaca-se ainda a camada superficial do solo referência com o valor mais elevado (0,24%). Apesar da palha e o solo apresentarem um considerável estoque de nitrogênio, apenas uma pequena fração desse elemento fica disponível na forma mineral, enquanto o restante permanece predominantemente complexado em formas não lábeis

(Santiago et al., 2013), o que requer atenção quanto a práticas de manejo que venham a ser empregadas.

A relação C/N do solo representa majoritariamente a fração da matéria orgânica estabilizada, sendo considerado parâmetro indicador do potencial húmico dos resíduos orgânicos do solo (Lynch, 1986). Para esta relação, os valores encontrados apresentaram variação entre as duas condições do solo e profundidades, sendo o valor mais alto na profundidade 0-5 cm do solo cana (9,53:1), o que indica característica de igualdade entre imobilização e mineralização (Silva, 2015). Esse resultado se assemelha ao obtido por Mendoza et al. (2000) em solo cultivado com cana-de-açúcar, onde não foi observada diferença na relação C/N em função do sistema de manejo da palha.

Os valores de pH variaram em função das condições de solo, sendo que o solo de referência apresentou característica mais ácida em relação ao solo cana. Em relação às profundidades, foi observado pequeno aumento da acidez nas profundidades 5-10 cm de ambos os solos. Isso se explica devido ao efeito promovido pelos resíduos depositados diretamente sobre as camadas 0-5 cm de ambos os solos, o que garante menor acidificação (Lepsch, 2011; Santos et al., 2006).

Os teores de Ca e Mg, foram mais elevados na profundidade 0-5 cm do solo-cana e do solo de referência. A esse resultado se atribui o aporte de matéria orgânica sobre a camada superficial de ambos os tipos de solo. Em um estudo de decomposição e liberação de nutrientes da palha, Oliveira et al. (1999) observaram liberação de grande quantidade de Ca e Mg e Ca ao solo, principalmente em camadas superficiais, com redução nas camadas inferiores devido à lixiviação no perfil do solo (Pavinato & Rosolem., 2008). Ainda segundo o autor, é uma característica típica dos nutrientes Ca e o Mg aumentarem na solução do solo, sob a adição de resíduos vegetais em solos com pH menor que 6,0.

Os elementos químicos P e K apresentaram teores mais elevados na profundidade 0-5 cm do solo cana, com diferença significativa em relação à profundidade e ao solo de referência. O elemento K apresentou ainda expressiva diferença em relação ao solo de solo de referência, indicando a influência direta da palha e do manejo empregado na dinâmica deste nutriente no solo (Andreotti et al., 2015). É importante ressaltar ainda que frações do P e K são rapidamente

liberadas no estágio inicial de decomposição, o que explica maiores teores nas camadas superficiais, principalmente no solo cana devido ao aporte de palha.

Os teores S podem variar com o uso contínuo do solo, podendo ocorrer perdas por erosão e consumo pelas culturas (Santos et al., 1981), contudo, foi observado maior teor de S na profundidade 5-10 cm do solo de referência, com diferença significativa em relação à profundidade 0-5 cm e ao solo cana. O teor de N apresentou pequena diminuição em relação à profundidade, contudo, houve diferença em relação ao tipo de solo.

Os valores de T (CTC a pH 7,0) foram mais elevados na profundidade 0-5 cm nos dois tipos de solo, apresentando ainda diferença entre profundidades. Esse comportamento também foi observado para os valores de t (CTC efetiva). Tal resultado pode se atribuir às variações de argila (Figueiredo-Portugal et al., 2010). De acordo com Mendoza et al. (2000), a liberação dos subprodutos humificados da decomposição da matéria orgânica resulta no aumento da CTC e consequentemente a disponibilidade de nutrientes no solo.

O valor de V diferiu entre o solo cana e as profundidades, porém se mostrou mais elevado na profundidade 0-5 cm em ambos os solos. O valor de SB foi mais elevado na profundidade 5-10 cm do solo de referência, com diferença significativa em relação às demais camadas dos solos. O valor de Al apresentou o mesmo comportamento, no entanto, os valores de acidez potencial ($H + Al$) não apresentaram diferença entre os tipos de solo e profundidades. Segundo Mendoza et al. (2000), esses valores podem ser alterados de acordo com a granulometria do solo, principalmente em função da fração argila do solo.

A análise física da composição granulométrica e classe textural (Tabela 4) indicou que os solos amostrados e suas respectivas profundidades são classificados como solos arenosos (EMBRAPA, 2006).

Tabela 4. Análise granulométrica e classificação textural do solo-cana e do solo de referência.

Tipo de Solo ⁽¹⁾	Prof. ⁽²⁾	Fração do Solo				Classificação Textural		
		Argila	Silte	AF ⁽³⁾	AM ⁽⁴⁾		AG ⁽⁵⁾	AT ⁽⁶⁾
Solo	SC1 0-5 cm	156	47	170	226	401	797	Arenoso
Cana	SC2 5-10 cm	158	42	175	238	387	800	Arenoso
Solo	SR1 0-5 cm	145	44	182	223	406	811	Arenoso
Referência	SR2 5-10 cm	164	43	181	217	395	793	Arenoso

(1)Tipo de solo: solo cana e solo referência; (2)Prof.: profundidade; (3)AF: Areia fina; (4)AM: Areia média; (5)AG: Areia grossa; (6)AT: Areia total.

Os resultados obtidos são importantes para compreensão da influência da manutenção da palha de cana-de-açúcar sobre o solo, consistindo ainda em uma explanação do potencial destes resíduos culturais associados com manejo adequado na substituição parcial da aplicação de insumos, principalmente fertilizantes, promovendo redução de custos e sustentabilidade à cultura da cana-de-açúcar.

4.2. Isolamento e estimativa populacional de microrganismos associados ao solo e palha de cana-de-açúcar

Para isolamento e estimativa da densidade populacional de microrganismos associados ao sistema solo-palha foram utilizadas diferentes formulações de meios de cultura, visando obter microrganismos com diferentes requisitos nutricionais e funcionais. Durante o processo de isolamento foi observado grande diversidade microbiana associada ao sistema solo-palha de cana-de-açúcar (Figura 5).

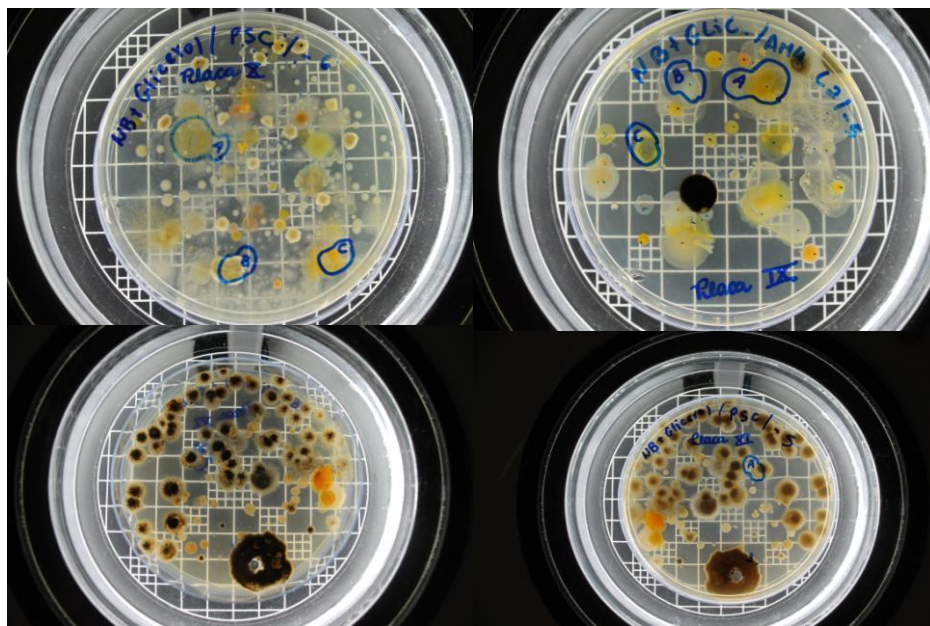


Figura 5. Diversidade microbiana obtida nas placas de Petri contendo diferentes formulações de meios de cultura.

Após o processo de isolamento foi obtido um total de 325 isolados microbianos, sendo 122 bacterianos (Apêndice 3) e 223 fúngicos (Apêndice 4). Esse total é resultado da soma dos microrganismos isolados nas camadas amostradas do sistema solo-palha, com a seguinte representatividade para isolados bacterianos e fúngicos, respectivamente: L1 43% e 19%, L2 40% e 17%, S1 7% e 26%, S2 2% e 21%, SR1 3% e 12% e SR2 5% e 5%.

A estimativa da densidade populacional de microrganismos associados ao sistema solo-palha da cana-de-açúcar foi determinada utilizando o método de contagem por unidades formadoras de colônias, e os valores expressos em $\log_{10} \cdot g^{-1}$ de solo ou palha. Para a contagem de bactérias foi utilizado o meio NB (Nutrient Broth) sólido, para os fungos o meio BDA (Batata Dextrose Agar). A fim de isolar e quantificar microrganismos capazes de degradar celulose foi utilizado meio com carboximetilcelulose (CMCm) e meio com ácido húmico (AH) como fonte exclusiva de carbono.

Após a contagem de bactérias baseada no meio NB sólido, foi observado maior número de células bacterianas na palha de cana-de-açúcar e nos solos sob o depósito de palha, respectivamente (Figura 6).

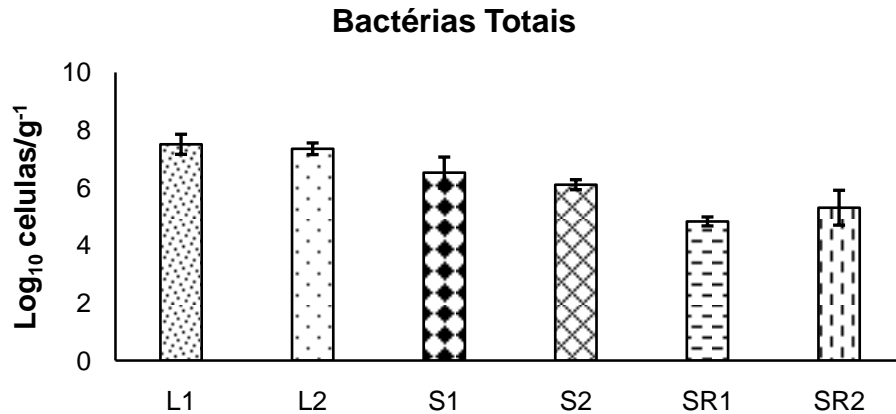


Figura 6. L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo-cana 0-5 cm; S2: Solo-cana 5-10 cm; SR1: Solo de referência 0-5 cm; SR2: Solo de Referência 5-10 cm.

O resultado obtido indica a influência do compartimento vegetal composto pela palha fresca (L1) e em estágio mais adiantado de decomposição (L2) na densidade populacional de bactérias. De acordo com Coba (2012), as bactérias são descritas como o grupo microbiano mais abundante, e apresentam incrementos populacionais na presença de material orgânico, o que explica os valores mais elevados na palha e no solo-cana, o qual apresenta maior aporte de matéria orgânica (Sylvia et al., 1998; Baath, 1998).

Para fungos, também foi observada contribuição direta da palha, sendo observado maiores valores para densidade populacional fúngica associada à palha e ao solo cultivado com cana-de-açúcar (Figura 7).

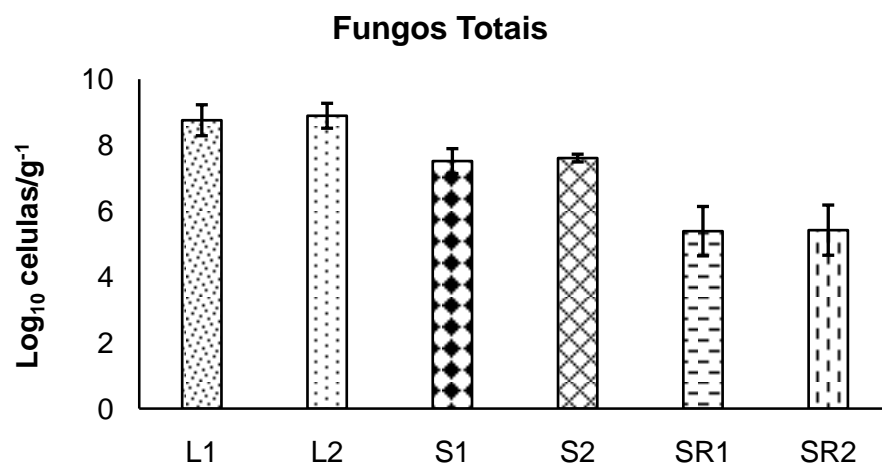


Figura 7. L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo-cana 0-5 cm; S2: Solo-cana 5-10 cm; SR1: Solo de referência 0-5 cm; SR2: Solo de Referência 5-10 cm.

A presença de um maior número de células fúngicas na palha e no solo cultivado com cana-de-açúcar é devido às características fisiológicas e metabólicas (saprofíticas) de diversos representantes deste grupo microbiano e conseqüentemente seu proeminente papel na decomposição de resíduos vegetais (Cardoso & Andreote, 2016). Em um estudo avaliando a dinâmica populacional da microbiota do solo, Pupin (2008) observou que além da deposição de resíduos vegetais, as práticas de manejo da cultura incluindo as adubações, influenciaram no número e na atividade fúngica do solo.

A contagem de microrganismos nos meios de cultura com celulose e ácido húmico como fontes exclusivas de carbono apresentou resultados distintos (Figura 8). No meio com celulose, foi observado valores mais elevados de células bacterianas em todas as frações, exceto na fração L1. Já no meio com ácido húmico, foi observado maior número de células bacterianas apenas na fração L1, nas demais frações houve dominância de células fúngicas.

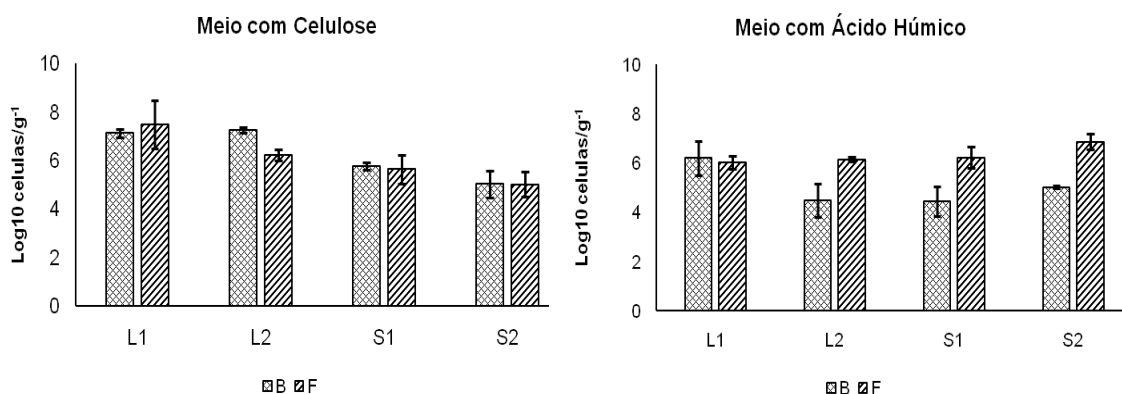


Figura 8. L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo-cana 0-5 cm; S2: Solo-cana 5-10 cm.

A palha de cana-de-açúcar possui cerca de 48% de celulose em sua estrutura (Yamaguchi, 2015), e diversos estudos abordam a eficiência do metabolismo microbiano na produção de enzimas lignocelulósicas (Singh. et al., 2008). Algumas espécies de fungos são capazes de secretar simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas, convertendo os polímeros lignocelulósicos em moléculas menores (Menezes & Barreto, 2015). Já as bactérias, devido à sua grande diversidade fisiológica e metabólica, podem produzir enzimas extracelulares com diferentes atuações sobre a celulose (Aguiar-Filho, 2008). Na

natureza, a ocorrência e a ação conjunta destes microrganismos na comunidade microbiana do solo proporcionam maior eficácia nas etapas de degradação dos polímeros lignocelulósicos (Haruta et al., 2002; Kato et al., 2004).

Em relação ao meio com ácido húmico, é importante considerar o papel dos microrganismos na decomposição da matéria orgânica e conseqüentemente na gênese das substâncias húmicas (Valdrighi et al., 1996). Desta forma, o crescimento microbiano, em especial de fungos no meio com ácido húmico como fonte exclusiva de carbono, indica o potencial e a participação dos isolados obtidos na dinâmica do carbono, visto que a relação C/N desses ácidos é cerca de 50% maior em relação à matéria orgânica do solo, indicando a recalcitrância dessas substâncias húmicas à mineralização microbiana (Baldotto & Baldotto, 2014).

Devido aos grandes aportes, a palha quando mantida sobre o solo apresenta efeitos positivos na matéria orgânica do mesmo e conseqüentemente nas comunidades microbianas (Morais, 2016; Vitti et al., 2008).

Nesse sentido, considerando apenas os solos, o solo cultivado com cana-de-açúcar apresentou valores mais expressivos para densidade populacional de fungos e bactérias em relação ao solo de referência. Além do carbono e demais nutrientes contidos na palha, a esse resultado pode ser atribuído o manejo empregado na área amostral (adubação e fertirrigação) que também pode contribuir para o aumento das populações microbianas do solo (Cargnin, 2007; Shultz et al., 2010; Quiterio, 2013). Tais práticas, como a fertilização, adicionam nutrientes facilmente assimiláveis pelos microrganismos, o que favorece o crescimento da biomassa microbiana (Yamaguchi et al., 2017).

No presente estudo foram observados maiores valores para a densidade populacional e número de isolados de fungos associados ao sistema solo-palha da cana-de-açúcar. Entretanto, a fração cultivável de microrganismos do solo é baixa (Malik et al., 2008), limitando a compreensão da real dinâmica populacional e diversidade microbiana do solo (Zilli et al., 2003).

Ao fim da contagem, a ordem de magnitude da densidade populacional tanto para bactérias quanto para fungos foi: Palha > Solo-cana > Solo de referência.

4.3. Potencial microbiano associado à dinâmica nutricional do sistema solo-palha da cana-de-açúcar

4.3.1. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio

O potencial de fixação biológica dos isolados bacterianos foi determinado pelo método qualitativo em meio Jnfb. As culturas em estoque dos isolados bacterianos obtidos na etapa do isolamento foram inoculadas no meio contido em vidros de penicilina, e após crescimento foi observada a formação de película característica de bactérias diazotróficas (Figura 9).



Figura 9. Isolados bacterianos com resultado positivo para a fixação biológica de nitrogênio.

Do total de 122 isolados bacterianos isolados obtidos a partir do processo de isolamento, 85 foram testados para a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, sendo encontrados 28 isolados (32,94%) com resultados positivos (Tabela 6).

Tabela 6. Isolados bacterianos positivos para o c potencial de fixação biológica de nitrogênio.

Isolados Bacterianos							
Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem
9	L2	42	L2	68	L2	201a2	L1
12	S1	43	L1	77	L1	202b2	L2
13a	L1	45	L2	150	S1	202c	L2
16	L1	50	SR1	151	S1	203a	L1
22	L1	52	L2	152	S1	204	S1
28	L2	59	L1	153	S1	205c	L2
30	L1	65	L2	200a	L2	206l	SR2

L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo-cana 0-5 cm; S2: Solo-cana 5-10 cm. SR1: Solo de referência 0-5 cm; SR2: Solo de referência 5-10 cm.

A maior parte dos isolados diazotróficos foi obtida a partir da palha (L1 e L2). Esse resultado pode ser explicado pela versatilidade metabólica de algumas espécies de bactérias diazotróficas que sob condições aeróbicas são capazes de produzir enzimas celulósicas (Hassal & Gibson, 1985; Dutta & Gachhui, 2007). Corroborando com esse resultado, a bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* comumente isolada na rizosfera de cana-de-açúcar apresentou em diversos estudos atividade enzimática degradativa (Olivares et al., 1996; Emtiazi et al., 2003; Adriano-Anaya et al., 2006).

O maior número de isolados obtidos da palha também é indicativo da colonização endofítica por parte das bactérias, uma vez que foi utilizada a maceração da palha para facilitar o processo de isolamento. Segundo o conceito de bactérias endofíticas, estas podem colonizar o interior das plantas sem causar danos estruturais às mesmas (Hallmann et al., 1997).

Inicialmente, a fixação biológica de nitrogênio foi descrita em bactérias diazotróficas na rizosfera e no rizoplano de gramíneas (Döbereiner, 1992; Manhani, 2005). A colonização endofítica favorece o processo de fixação biológica de nitrogênio, visto que o complexo enzimático da nitrogenase é altamente sensível ao oxigênio (Reis & Teixeira, 2005).

Segundo Hara et al. (2009), algumas bactérias diazotróficas em função de suas necessidades fisiológicas são capazes de crescer em meio sólido. Desta

forma, o número de isolados obtidos pode não condizer com a realidade da microbiota do sistema solo-palha estudado.

Dentre os isolados obtidos, 12 apresentaram melhores resultados, são eles 9, 12, 13a, 42, 52, 59, 77, 150, 151, 153, 203a e 206I, sendo selecionados para os ensaios de compatibilização entre microrganismos com potencial de interesse agrícola e biotecnológico.

4.3.2. Avaliação prévia do potencial microbiano na decomposição de compostos lignocelulósicos

Para os ensaios preliminares de capacidade de produção de enzimas lignocelulósicas, foram utilizados os isolados fúngicos obtidos a partir da palha de cana-de-açúcar e nos meios de cultura com celulose e ácido húmico como fontes exclusivas de carbono.

Foi utilizado um meio de cultura contendo apenas palha de cana-de-açúcar moída e peneirada em malha de 1 mm como fonte exclusiva de carbono. Após incubação e análise, não foi observado a presença de halo avermelhado indicando a produção de lignoceluloses, contudo, foi observado crescimento de alguns isolados microbianos, indicando capacidade de absorver carbono contido na palha (Figura 10).

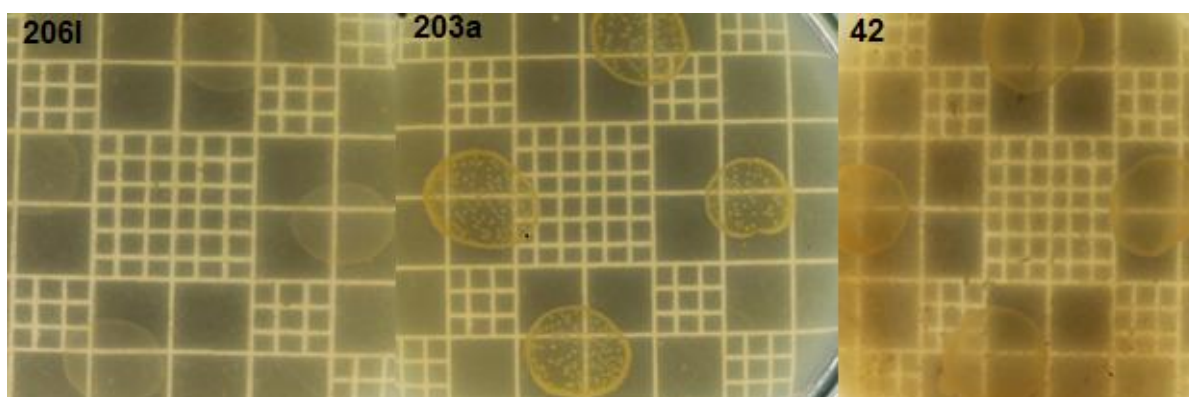


Figura 10. Crescimento de microrganismos em meio com palha de cana-de-açúcar como fonte exclusiva de carbono.

Foram testados 23 isolados bacterianos e 30 isolados fúngicos. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 7. Resultados dos isolados microbianos para o potencial de produção de enzimas lignocelulósicas.

Isolados													
Bacterianos						Fúngicos							
9	+	50	-	152	-	42F	+	365	-	430	-	500	+
12	+	52	+	153	-	300	+	378	-	433	+	501	-
13a	+	55	-	202	+	302	+	383	-	435	+	503	+
18	-	59	+	202b2	+	308	-	395	+	460	-	511	-
22	-	65	-	203a	+	315	-	399	+	461	+	512	-
42	+	77	+	205C	+	326	-	400	+	476	+	513	-
45	-	150	+	206I	+	351	+	401	-	493	-	-	-
46	-	151	-	-	-	357	+	402	-	494	-	-	-

A utilização da própria palha como fonte de carbono induz os microrganismos a produzirem maiores níveis de enzimas, por conter em sua composição um elevado teor de açúcares totais e o crescimento microbiano sob essas condições evidencia o potencial enzimático dos microrganismos (Fernandez, 1996)

Após crescimento e repicagem, foi observado que ambos os grupos microbianos apresentaram potencial enzimático. No entanto, os fungos são considerados os microrganismos mais importantes na produção de enzimas lignocelulósicas (Pereira, 2012). Em um estudo avaliando o potencial enzimático de fungos, Bortolazzo (2011) testou a atividade celulósica de 14 isolados e após análises apenas 2 isolados apresentaram atividade celulósica abaixo do controle.

Os microrganismos que apresentaram resultados positivos foram confrontados em ensaios de compatibilização para posteriores testes de degradação de palha de cana-de-açúcar *in situ*.

4.4. Compatibilidade entre Isolados Bacterianos e Fúngicos

Por meio dos ensaios, a compatibilidade dos isolados foi classificada de acordo com o crescimento dos fungos sobre as bactérias: alta (C1), média (C2) e baixa compatibilidade (C3) como apresentado na figura 11.

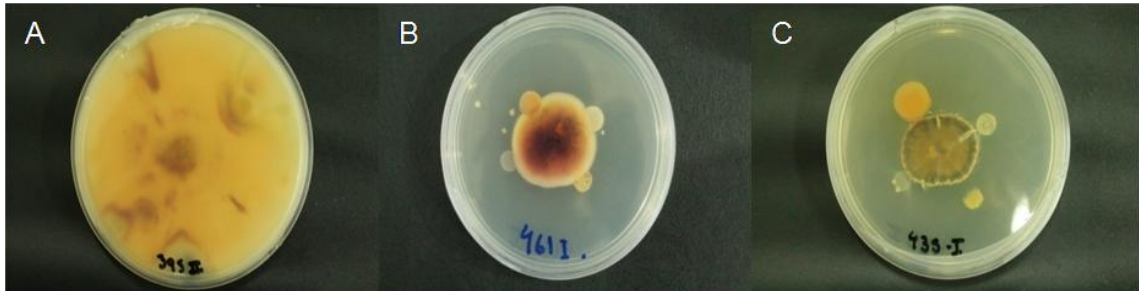


Figura 11. Exemplos de ensaios de compatibilidade entre isolados fúngicos e bacterianos. A: Alta compatibilidade (C1); B: Média compatibilidade (C2); C: Baixa compatibilidade (C3). Em que A: Fungo 395 x Bactérias 153, 151, 206l e 203a; B: Fungo 461 x Bactérias 12, 9, 42 e 13a; C: Fungo 435 x Bactérias 12, 9, 42 e 13a.

Para os ensaios de compatibilização microbiana, foram selecionados 24 isolados, sendo 12 bacterianos (Figura 12a) e 12 fúngicos (Figura 12b), com características funcionais benéficas, fixação biológica de nitrogênio e potencial de produção de enzimas lignocelulósicas (Döbereiner, 1997; Ciotta, 2003).

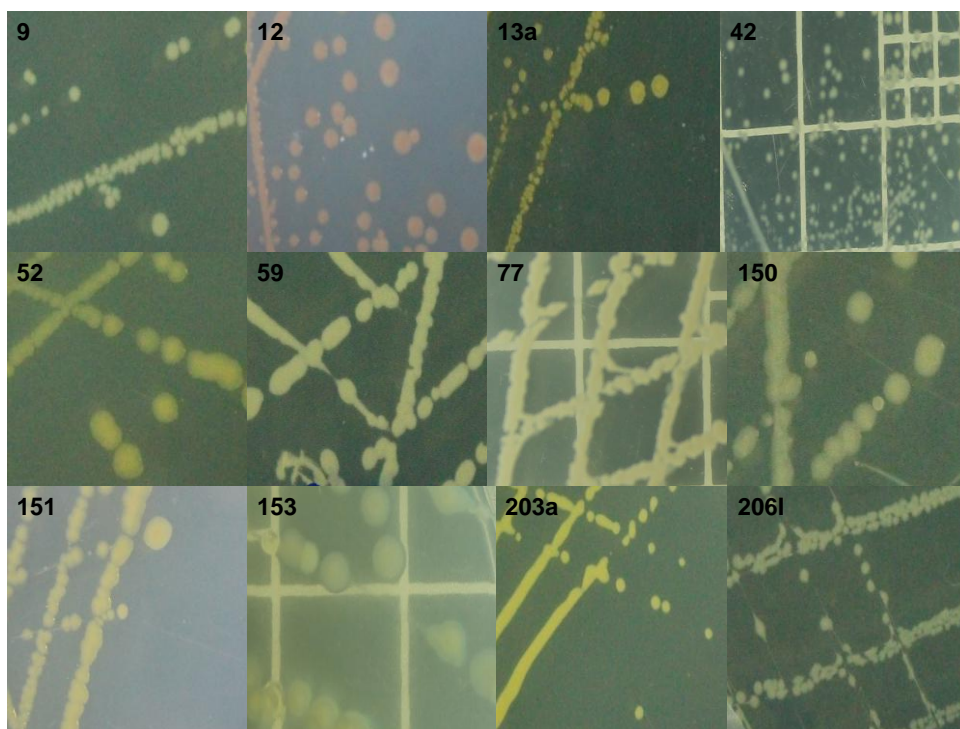


Figura 12a. Isolados bacterianos selecionados para o ensaio de compatibilização.

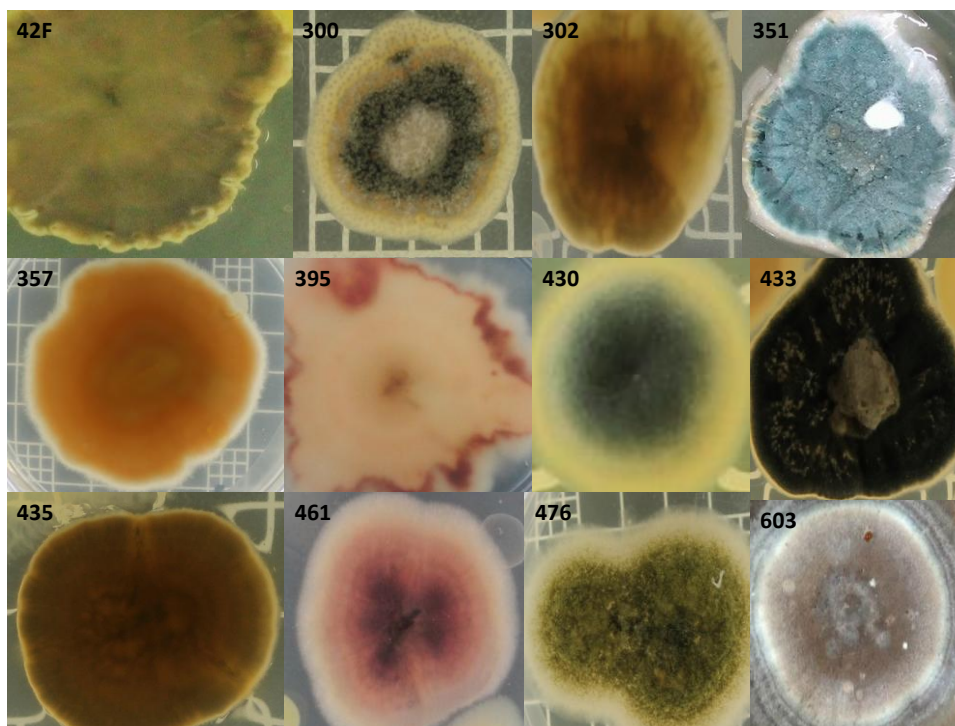


Figura 12b. Isolados fúngicos selecionados para o ensaio de compatibilização.

Após os ensaios de confrontamento, foram encontrados os resultados de compatibilidade apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Compatibilidade entre os isolados fúngicos degradadores e isolados bacterianos diazotróficos. Alta compatibilidade (C1); média compatibilidade (C2) e baixa compatibilidade (C3).

Isolados Fúngicos	Isolados Bacterianos											
	9	12	13a	42	52	59	77	150	151	153	203a	206l
42f	C3	C2	C3	C2	C3	C3	C3	C2	C2	C2	C2	C2
300	C1	C1	C3	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C2	C3	C2
302	C3	C3	C2	C3	C3	C3	C3	C2	C3	C2	C3	C3
351	C2	C3	C1	C3	C3	C1	C1	C2	C2	C1	C1	C2
357	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
395	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
430	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C2	C3	C2	C3	C3
433	C3	C2	C3	C3	C2	C3	C3	C2	C3	C2	C2	C3
435	C3	C2	C3	C2	C2	C3	C3	C2	C2	C2	C3	C2
461	C3	C3	C3	C3	C3	C2	C1	C2	C3	C3	C3	C2
476	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
503	C3	C3	C3	C3	C3	C2	C2	C2	C3	C3	C3	C2

O isolado 435 apresentou resultados positivos, demonstrando compatibilidade média com sete dos doze isolados testados. Contudo, apresentou

crescimento lento, o que pode ter influenciado negativamente na compatibilidade dentro do período de incubação e análise. O mesmo resultado foi observado nos isolados fúngicos 302 e 430. Aguiar (2017), em um ensaio de compatibilização entre fungos e bactérias promotoras do crescimento vegetal, também relatou crescimento lento por parte de fungos, não sendo possível detectar halo de compatibilidade ou incompatibilidade entre *Aspergillus caesiellus* e as bactérias testadas.

Apenas os isolados fúngicos 357, 395 e 476 apresentaram alta compatibilidade com todos os isolados bacterianos.

Dentre os isolados bacterianos, o resultado mais proeminente foi obtido com o isolado diazotrófico 150, o qual apresentou compatibilização de média a alta com todos os isolados fúngicos testados, exceto com o isolado 300, o qual também foi incompatível com os isolados 13a, 151 e 203a.

A interação entre bactérias diazotróficas e fungos decompositores apresenta-se benéfica devido aos processos biológicos onde pode influenciar positivamente em razão da atuação de microrganismos com diferentes papéis funcionais (De Roy et al., 2014). Na decomposição de compostos lignocelulósicos, processo no qual as bactérias apresentam papel importante no processo, devido à capacidade de suprir ao menos parcialmente os requisitos de nitrogênio dos fungos nos sítios de decomposição enquanto obtêm carbono, diminuindo as taxas de imobilização durante a decomposição da matéria orgânica (Hassal & Gibson, 1985; Dietrich, 2014).

Na fixação biológica de nitrogênio, esta interação também se mostra favorável ao processo. Em um estudo com inoculações consorciadas entre fungos e bactérias diazotróficas em plantas de trigo, Sala et al. (2007), observaram efeitos sinérgicos na colonização das raízes pelas bactérias, o que contribui positivamente na interação planta-bactéria. Contudo, ainda há escassez de estudos que descrevam a influência de determinados grupos microbianos na colonização de raízes de plantas (Andrade, 2013).

A compatibilização microbiana *in vitro* aproxima os ensaios às condições de comunidades microbianas, as quais estes microrganismos são encontrados na natureza. As culturas que consistem com múltiplas espécies microbianas, por definição, contêm uma maior variedade de genes e capacidades metabólicas em comparação com monoculturas (Hays et al., 2015).

4.5. Quantificação de grupos redutores totais (GRT)

Os resultados de grupos redutores totais liberados da palha de cana-de-açúcar em meios inoculados com bactérias, fungos e com inoculações mistas de bactérias e fungos estão apresentados abaixo e os valores de GRT expressos em g.L^{-1} .

Em ambos os meios (I e II) inoculados com bactérias, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 13). Entretanto, foi observado predomínio da característica de aumento das concentrações de grupos redutores totais (GRT) durante o período de incubação. Tais resultados evidenciam a capacidade dos isolados testados na degradação da palha de cana-de-açúcar de forma semelhante.

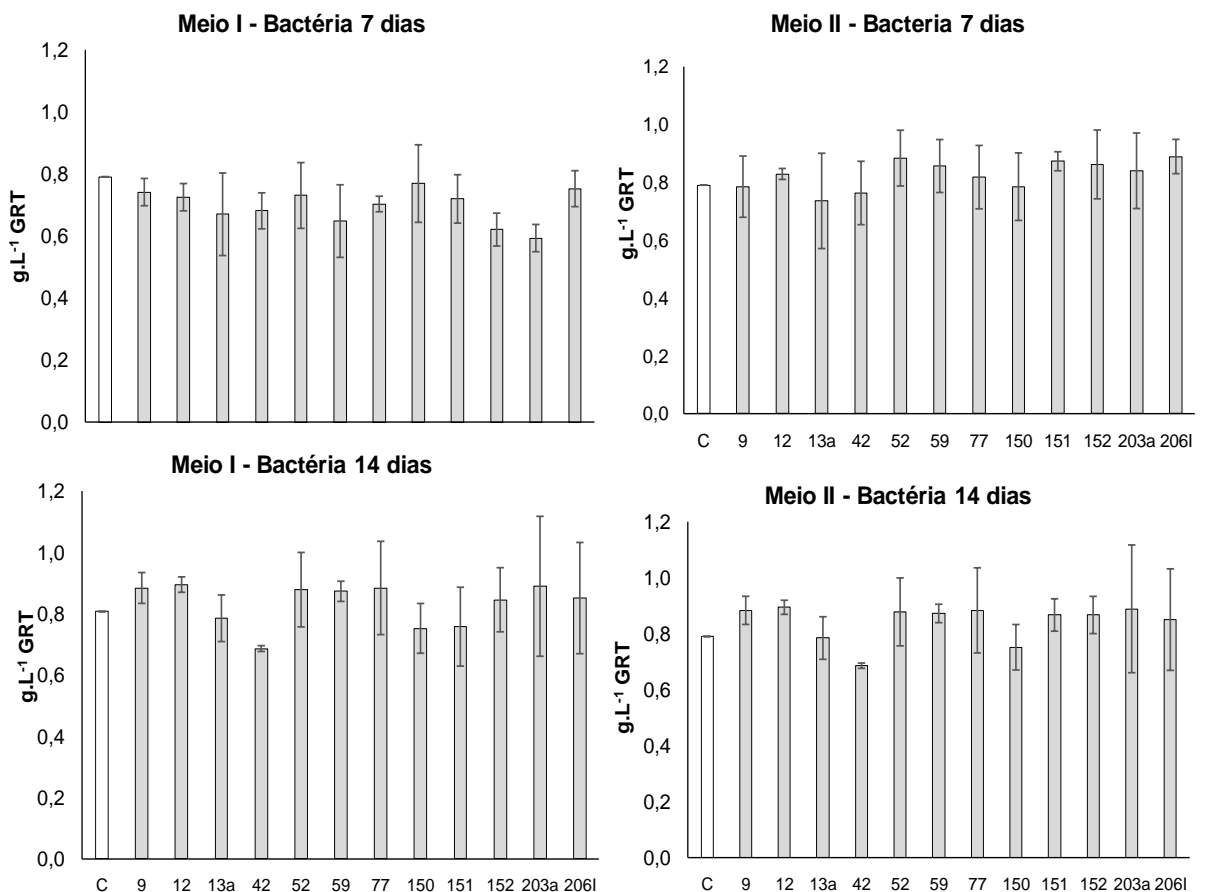


Figura 13. Concentrações dos grupos redutores totais (GRT) nos meios de cultura inoculados com bactérias ao longo do período de incubação no meio I e meio II. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de *Skott-Knott* em 5% de probabilidade.

Embora as bactérias não sejam os principais microrganismos produtores de enzimas lignocelulósicas, vários representantes desse grupo microbiano já foram descritos como produtores destas enzimas (Schwarz, 2001; Eida et al., 2012). Ressalta-se ainda que a atividade enzimática desempenhada por bactérias apresenta funções específicas na degradação de biomoléculas, uma vez que diversos gêneros bacterianos são colonizadores de ambientes sob condições anaeróbicas, usando complexos sistemas enzimáticos altamente eficientes (Haichar et al., 2007; Gupta et al., 2012).

Ao fim dos 14 dias de incubação, não foi observada diferença significativa entre as bactérias e entre o meio I e meio II. Contudo, o isolado 12 apresentou os valores mais elevados em ambos os meios, sendo 0,895 g.L⁻¹ no meio I e 0,894 g.L⁻¹ no meio II.

Para os fungos inoculados (Figura 14), foi observado somente diferença significativa entre os tratamentos após 14 dias de inoculação no meio I, no qual houve predomínio da característica de aumento dos valores de grupos redutores totais, sendo os valores mais elevados obtidos com os isolados 42F (0,950 g.L⁻¹), 300 (0,922 g.L⁻¹) e 302 (0,900 g.L⁻¹), 351 (0,894 g.L⁻¹), 433 (0,894 g.L⁻¹), 430 (0,889 g.L⁻¹), 435 (0,878 g.L⁻¹) e 395 (0,856 g.L⁻¹), com respectivo aumento de 15,29%, 11,35%, 8,69%, 12,31%, 15,50%, 11,68%, 9,6% e 21,93% em relação a 7 dias de incubação.

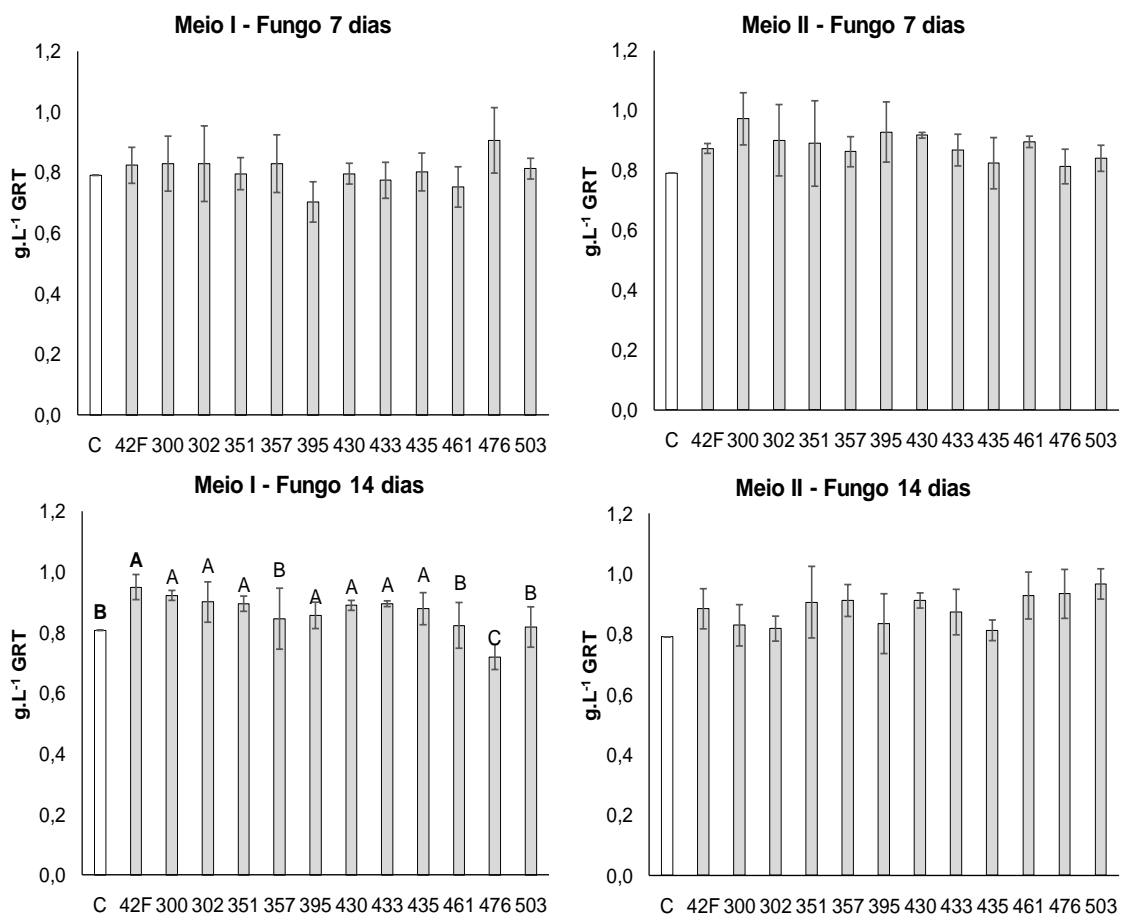


Figura 14. Concentrações dos grupos redutores totais (GRT) nos meios de cultura inoculados com fungos ao longo do período de incubação no meio I e meio II. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de *Skott-Knott* em 5% de probabilidade.

A tendência de aumento observada nos valores de grupos redutores totais se deve à produção de enzimas lignocelulósicas pelos isolados fúngicos e às maiores taxas de liberação de açúcares em relação às taxas de consumo, resultando em maiores concentrações de GRT no meio (Blandino et al., 2001).

No meio II, apenas os isolados 351, 357, 461, 476 e 503 apresentaram característica de aumento nos valores de GRT, atingindo os respectivos valores de 0,905 g.L⁻¹(+1,80%), 0,911 g.L⁻¹(5,80%), 0,927 g.L⁻¹(3,69%), 0,933 g.L⁻¹(14,90%) e 0,966 g.L⁻¹(16,24%) após 14 dias.

Esse resultado pode ser atribuído à adição de uma fonte extra de carbono ao meio. Em um ensaio de avaliação da produção de enzimas *in vitro* de *Aspergillus awamori*, Botella et al (2007) verificaram que a adição de uma fonte extra de carbono resultou no declínio da atividade enzimática. Desta forma, a hidrólise pode ter sido influenciada negativamente enquanto os açúcares liberados foram incorporados à biomassa microbiana, reduzindo ou mesmo mantendo os valores de GRT no meio.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios com bactérias e fungos, isolados representantes destes grupos microbianos foram selecionados para um ensaio consorciado (Bactéria+fungos). Para este ensaio, também foram considerados os resultados dos testes de compatibilidade (Tabela 8), sendo selecionados os isolados bacterianos 12, 59, 77 e 203a e os isolados fúngicos 357, 395, e 476.

Algumas combinações também foram propostas devido ao efeito fúngico no crescimento bacteriano, sendo selecionados os isolados fúngicos 302, 433, 435 e 461 sobre o crescimento dos isolados bacterianos diazotróficos 150 e 153 (Figura 15).

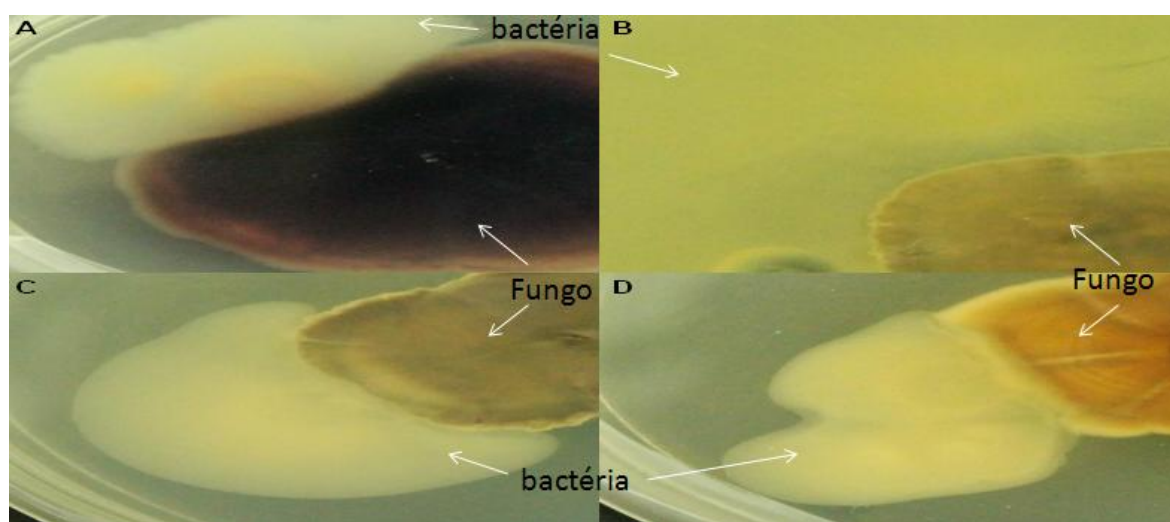


Figura 15. Efeito de isolados fúngicos sobre o crescimento bacteriano. A: 461+153; B: 435+153; C: 302+150; 433+150.

Depois de selecionados, os microrganismos foram incubados de forma consorciada, sob as mesmas condições e com o mesmo período de avaliação dos ensaios anteriores. Os resultados obtidos apresentados indicam que o íntimo contato entre o fungo e a bactéria induz nas colônias de bactérias a produção intensa de exopolissacarídeos. Esta característica pode ser relevante para otimização da atividade de decomposição microbiana pelo consórcio, tendo em vista o efeito protetor destes polímeros sobre a viabilidade e atividade microbiana.

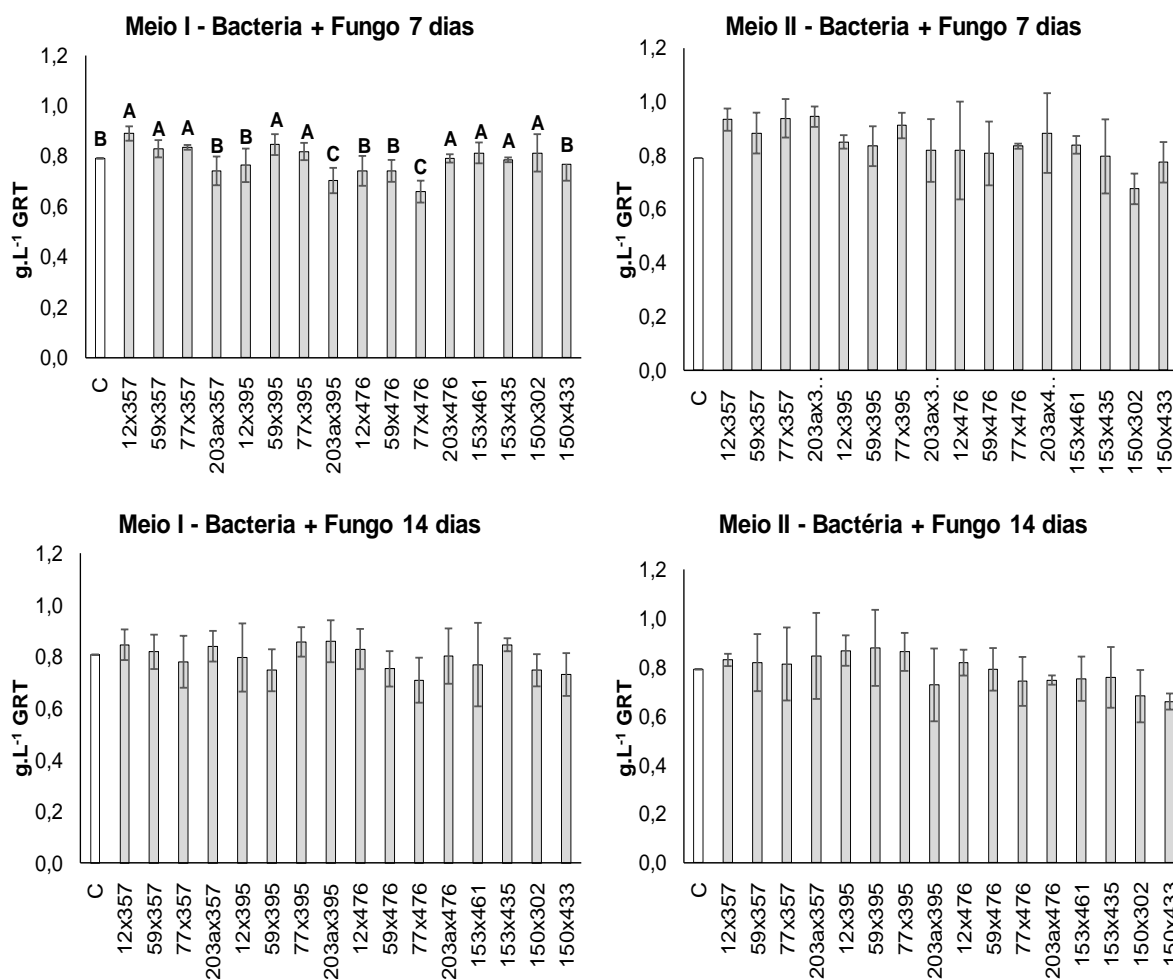


Figura 16. Concentrações dos grupos redutores totais (GRT) nos meios de cultura inoculados com combinações de bactérias e fungos ao longo do período de incubação no meio I e meio II. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de *Skott-Knott* em 5% de probabilidade.

No meio I, foi observado que 8 dentre as 16 combinações testadas, demonstraram redução nos valores de GRT entre 7 e 14 dias de incubação, enquanto as demais, apresentaram característica de aumento. Este resultado pode ser atribuído à atividade enzimática desempenhada pelos microrganismos, que pode ser influenciada pela interação positiva dos mesmos (Wongwilaiwalin et al., 2010).

Nesse caso, a ação conjunta e sinérgica das enzimas liberadas pelos microrganismos durante a incubação degrada a palha (única fonte de carbono no meio I) em açúcares que podem ser liberados, aumentando os valores de GRT no meio ou incorporados à biomassa microbiana (Aguiar, 2010). Neste contexto, a interação entre o isolado bacteriano 59 e o isolado fúngico 395 foi a única que apresentou valores superiores aos das inoculações isoladas destes microrganismos. No entanto, este resultado só foi obtido no meio II.

No meio com a fonte extra de carbono (0,01% de Manitol), 12 dentre as 16 combinações propostas, apresentaram redução nos valores de GRT após 14 dias (Figura 16). Em um estudo comparando fontes de carbono em meios de cultura para a produção de celulose microbiana, Oliveira e Carminatti (2016) observaram que a adição de Manitol como fonte extra de carbono favorece o crescimento da biomassa microbiana, o que explica a redução dos valores de GRT no meio em função do consumo de carbono pelos microrganismos.

Ao fim, foi observado que independente da adição de 0,01% de Manitol como fonte extra de carbono, os valores médios de grupos redutores totais não apresentaram diferenças consideráveis.

5. CONCLUSÕES

O solo cultivado com cana-de-açúcar e sob o depósito de palha apresentou valores mais elevados de potássio, magnésio e sódio, somas de bases e CTC.

Foram encontrados maiores números de isolados fúngicos em relação às bactérias, sendo a palha depositada sobre o solo um fator condicionante na densidade das populações microbianas do solo.

Foram obtidos 28 isolados diazotróficos, e 27 com potencial de degradação de polímeros celulósicos, sendo 13 bacterianos e 14 fúngicos.

Apenas os isolados fúngicos 357, 395 e 476 apresentaram alta compatibilidade com todos os isolados bacterianos testados.

O isolado 12 apresentou os valores mais elevados de grupos redutores totais no Meio I e Meio II.

A inoculação mista com os isolados 59 e 395 foi a única que apresentou valores superiores de grupos redutores totais em relação aos ensaios de culturas puras.

A adição de manitol como fonte de carbono lábil não resultou em diferenças consideráveis nos valores finais de grupos redutores totais acumulados no meio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano-Anaya ML, Salvador-Figueroa M, Ocampo JA, Garcia-Romera I (2006) Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol Biochem* 38: 879-886.
- Alvares, C. A.; Stape, J. L.; Sentelhas, P. C.; Gonçalves, J. L. M.; Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. 2013: v. 22, n. 6, p. 711-728.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. J., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Anda – Associação Nacional Para Difusão De Adubos. Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes. São Paulo, 2010. 58 BNDES 60 ANOS – PERSPECTIVAS SETORIAIS. 1º Congresso Brasileiro de Fertilizantes. 2011. Disponível em: . Acesso em: 26 OUT. 2017.
- Andrade, Pedro Avelino Maia de. A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum*. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Andreotti, M., Soria, J. E., Costa, N. R., Gameiro, R. D. A., & Rebonatti, M. D. (2015). Acúmulo de nutrientes e decomposição do palhicho de cana em função de doses de vinhaça. *Bioscience Journal*, 563-576.

- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L. and Döbereiner, J. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely *H. rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13: 65-73.
- Berendsen, Roeland L.; Pieterse, Corne MJ; Bakker, Peter A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.
- Brasil,, Ministério de Minas e Energia. Balanço Energético Nacional. Disponível em:
<https://ben.epe.gov.br/BENRelatoriolnicial.aspx?anoColeta=2017&anoFimColeta=2016>. Acessado 26 outubro 2017.
- Brasil. Conab – Companhia Brasileira de Abastecimento. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA de Cana-de-açúcar. V. 2 - SAFRA 2016/17 N.4 - Quarto levantamento, ABRIL 2017
- Brasil. Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de cana-de-açúcar e Agroenergia. Estimativa do Valor Bruto da Produção do Setor Sucroalcooleiro na Safra 2016/2017. Disponibilizado por sistemasweb.agricultura.gov.br.
- Campos, D. C. Potencialidade do sistema de colheita sem queima da cana-de-açúcar para o seqüestro de carbono. 2003, 1003f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba, SP.
- Cardoso, E. J. B. N & Andreotte, F. D. Microbiologia do Solo [recurso eletrônico]. – 2ª. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- Cardoso, E. J. B. N., Tsai, S. m., Neves, M. C. P. Microbiologia do solo. 360p. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas, 1992.
- Cas, Véra Lúcia Simon da et al. Mineralização do carbono e do nitrogênio no solo com o uso de lodo de esgoto e palha de aveia. 2009.
- Castro, S. G. Q. D., Franco, H. C. J., & Mutton, M. Â. (2014). Harvest managements and cultural practices in sugarcane. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(1), 299-306.
- Chagas, M. F., Bordonal, R. O., Cavalett, O., Carvalho, J. L. N., Bonomi, A., & La Scala, N. (2016). Environmental and economic impacts of different sugarcane production systems in the ethanol biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(1), 89-106.

- Ciotta, M. N., Bayer, C., Fontoura, S. M. V., Ernani, P. R., & Albuquerque, J. A. (2003). Matéria orgânica e aumento da capacidade de troca de cátions em solo com argila de atividade baixa sob plantio direto. *Ciência rural. Santa Maria. Vol. 33, n. 6 (nov./dez. 2003), p. 1161-1164.*
- Costa, M. C. G., Vitti, G. C., & Cantarella, H. (2003). N-NH₃ losses from nitrogen sources applied over unburned sugarcane straw. *Revista Brasileira de Ciência do Solo, 27(4), 631-637.*
- da Silva, A. S. A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., & Bon, E. P. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource technology, 101(19), 7402-7409.*
- da Silva, Marcia Heloisa. Comunidades Fúngicas Endofítica, Epifítica e Rizosférica em Diferentes Ecossistemas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
- de Oliveira Rodrigues, P., de Cássia Pereira, J., dos Santos, D. Q., Gurgel, L. V. A., Pasquini, D., & Baffi, M. A. (2017). Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products, 109, 173-181.*
- de Souza Correia, Geanna Gonçalves; MARTINS, Sebastião Venâncio. Banco de Sementes do Solo de Floresta Restaurada, Reserva Natural Vale, ES. *Floresta e Ambiente, v. 22, n. 1, p. 79-87, 2015.*
- Döbereiner, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e cultura, v. 44, n. 5, 1992.*
- Döbereiner, Johanna. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência, p. 2-3, 1997.*
- Dutta, Debasree; Gachhui, Ratan. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 57, n. 2, p. 353-357, 2007.*
- Eida, Mohamed Fathallh et al. Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes and environments, v. 27, n. 3, p. 226-233, 2012.*
- Haichar El Zachar, Feth et al. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology, v. 9, n. 3 p. 625-634, 2007.*

- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Brasileiro de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro – RJ). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ª ed. 306 p – Rio de Janeiro, 2006.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. -2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 1997.
- Emziati, G.; Etemadifar, Z.; Tavassoli, M. A novel nitrogen-fixing cellulolytic bacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein. *Biomass and Bioenergy*, v. 25, n. 4, p. 423-426, 2003.
- Fábio R. Marin, Geraldo B. Martha, Jr., Kenneth G. Cassman, Patricio Grassini; Prospects for Increasing Sugarcane and Bioethanol Production on Existing Crop Area in Brazil, *BioScience*, Volume 66, Issue 4, 1 April 2016, Pages 307–316, <https://doi.org/10.1093/biosci/biw009>
- Figueiredo-Portugal, A.; DelÁrco, V.C.; Costa, O.. Propriedades físicas e químicas do solo em áreas com sistemas produtivos e mata na região da Zona da Mata mineira. *Revista Brasileira de ciência do solo*, v. 34, n. 2, 2010.
- Gama-Rodrigues, A. C. ; Gama-Rodrigues, F, E; Brito, Elio Cruz de. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais de plantas de cobertura em Argissolo Vermelho-Amarelo na região Noroeste Fluminense (RJ). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, n. 6, 2007.
- Guimarães Moreira Maluf, H. J., Barros Soares, E. M., Ribeiro da Silva, I., Lima Neves, J. C., & de Oliveira Guimarães Silva, L. (2015). Decomposição de resíduos de culturas e mineralização de nutrientes em solo com diferentes texturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39(6).
- Gupta, Pratima; Samant, Kalpana; Sahu, Avinash. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International journal of microbiology*, v. 2012, 2012.
- Halmman et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* V. 43, p. 895-914, 1997.
- Hara, S.; Hashodoko, Yy.; Desyatkin, R.V.; Hatano, R.; Tahara S. High Rate of N₂ Fixation by East Siberian Cryophilic Soil Bacteria as Determined by Measuring Acetylene Reduction in Nitrogen-Poor Medium Solidified with Gellan Gum. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 9, p. 2811-2819, 2009.

- Hedges, J. L.; Mann, D. C., the lignin geochemistry of marine sediments from the southern Washington coast. *Geochimica Cosmochimica Acta* 43, 1809-1818, 1979.
- Haruta, S., Cui, Z., Huang, Z., Li, M., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2002). Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 529-534.
- Hedges, J. L.; Clark, W. A.; Cowie, G. L. organic matter sources to the water column and surficial sediments of marine bay. *Limnology and Oceanography*, v. 33, 1116-1136, 1988.
- Irena. Five-Year Global Supply And Demand Projections. V. 44, N. October 2013, P. 1–74, 2014.
- Jia, X., Liu, C., Song, H., Ding, M., Du, J., Ma, Q., & Yuan, Y. (2016). Design, analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synthetic and systems biotechnology*, 1(2), 109-117.
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., & Chang, S. C. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4(3), 179-183.
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2004). Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 51(1), 133-142.
- Khatiwada, D., Leduc, S., Silveira, S., & McCallum, I. (2016). Optimizing ethanol and bioelectricity production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable Energy*, 85, 371-386.
- Lamb, Eric G.; Kennedy, Nabla; Siciliano, Steven D. Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant and Soil*, v. 338, n. 1-2, p. 483-495, 2011.
- Leal, M. R. L., Galdos, M. V., Scarpore, F. V., Seabra, J. E., Walter, A., & Oliveira, C. O. (2013). Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature review. *Biomass and Bioenergy*, 53, 11-19.
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Wang, A. (2013). Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium—a review. *Bioresource technology*, 136, 697-706.

- Lee, Jongtae. Effect of application methods of organic fertilizer on growth, soil chemical properties and microbial densities in organic bulb onion production. *Scientia Horticulturae*, v. 124, n. 3, p. 299-305, 2010.
- Lepsch, I.F. 19 lições de pedologia. São Paulo: Oficina de Textos, 2011. 456p.
- Lira-Cadete, L., de Farias, A. R. B., de Souza Ramos, A. P., da Costa, D. P., Freire, F. J., & Kuklinsky-Sobral, J. (2012). Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. *Bioscience Journal*, 28(1).
- Lynch, J.M. Biotecnologia do solo. São Paulo- SP, Manole, 1986.
- Magnani, Giovana de Souza. Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- Malik, S.; Beer, M.; Megharaj, M.; Naidu, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, Amsterdam, v. 34,p.265-276, 2008.
- Marchiori, L.F.S., 2004. Influência da época do plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar. Tese (Doutorado) – Piracicaba – SP: Universidade de São Paulo, 2004.
- Marin, V., Baldani, V., Teixeira, K., Baldani, J. Fixação biológica de Nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Seropédica, 1999. 34p. *Série Documentos. Embrapa Agrobiologia*.
- Mattos, M.L.T. Microbiologia do solo. Embrapa Clima Temperado-Capítulo em livro científico (ALICE). 2005.
- Megda, M. X. V., Trivelin, P. C. O., Franco, H. C. J., Otto, R., & Vitti, A. C. (2013). Eficiência agrônômica de adubos nitrogenados em soqueira de cana-de-açúcar colhida sem queima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(12), 1681-1690.
- Mendonza, H. N. S.; Lima, E.; Anjos, L. H. C.; Silva, L. A.; Cedia, M. B.; Antunes, M. V. M. Propriedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. *R. Bras Ci Solo*. 2000: 24:201-207.

- Misra, Varucha; Solomon, S.; Ansari, Mohammad Israil. Impact of drought on post-harvest quality of sugarcane crop. *Adv. Life Sci*, v. 20, n. 5, p. 9496-9505, 2016.
- Møller, J., Miller, M., & Kjølter, A. (1999). Fungal–bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(3), 367-374.
- Møller, J., Miller, M., & Kjølter, A. (1999). Fungal–bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(3), 367-374.
- Monteiro, Monica Cristina Pereira. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
- Morais, Maristela Calvente. Efeito da remoção de quantidades de palha de cana-de-açúcar na biomassa e na comunidade microbiana do solo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo 2ª ed. Atual. e ampli. – Lavras: Editora UFLA, 2006.
- Olivares, F. L.; Baldani, V. L. D.; Reis, V. M.; Baldani, J. I.; Döbereiner, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils*, v. 21, p. 197-200, 1996.
- Oliveira, Ana Paula Pessin de. Atributos Edáficos e Adubação Nitrogenada em Cana de açúcar em Tabuleiros Costeiros: Resposta a Sistemas de Colheita com e sem Queima da Palhada. Tese (Doutorado) – Seropédica – RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.
- Oliveira, H.N., Antigo, M.R., Carvalho, G.A., And Glaeser, D.F. Effect Of Selectivity Of Herbicides And Plant Growth Regulators Used In Sugarcane Crops On Immature Stages Of *Trichogramma Galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Planta Daninha, Viçosa-Mg*, V. 32, N. 1, P. 125-131, 2014
- Oliveira, M. W.; Barbosa, M. H. P.; Mendes, L. C.; Damasceno, C. M. Matéria seca e nutrientes na palhada de dez variedades de cana-de-açúcar. *Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos*. 2003: v. 21, n. 3, p. 30-31.

- Oliveira, R.P.; Schultz, N.; Monteiro, R.C.; Pereira, W.; Araújo, A.; Urquiaga, S.; Reis, V.M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. *African Journal of Agricultural Research*. 2016: v.11, p.2786-2795.
- Otto, R. Silva, A. P.; Franco, H. C. J.; Oliveira, E. C.A.; Trivelin, P. C. O. High soil penetration resistance reduces sugarcane root system development. *Soil and tillage research* 117, 201-210, 2011.
- Pallu, Ana Paula de Souza. Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.
- Pavinato, P.C. & Rosolem, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. *R. Bras. Ci. Solo*. 2008. 32:911- 920, 2008.
- Pereira, V. M. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer. 2012. 112p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2012.
- Pereira, William. Eficiência de recuperação de nitrogênio pela cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada de plantio e da inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017
- Pinheiro, E. F. M.; Lima, E.; Ceddia, M. B.; Urquiaga, S.; Alves, B. J. R.; Boddey, R. M. Impact of pre-harvest burning versus trash conservation on soil carbon and nitrogen stocks on a sugarcane plantation in the Brazilian Atlantic forest region. *Plant & Soil*. 2010: 333:71–80.
- Pisa, Giovani. Diversidade de bactérias do solo aderido à raiz de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.
- Portz, G., Molin, J. P., & Jasper, J. (2012). Active crop sensor to detect variability of nitrogen supply and biomass on sugarcane fields. *Precision Agriculture*, 13(1), 33-44.

- Quitério, Gabriela Mercuri et al. Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante= Evaluation of vinasse biodegradation in soil by addition of biofertilizer. 2013.
- Raja, P., Uma, S., Gopal, H., & Govindarajan, K. (2006). Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *J Biol Sci*, 6, 815-823.
- Ramos, N. P., Yamaguchi, C. S., Pires, A. M. M., Rossetto, R., Possenti, R. A., Packer, A. P., ... & de Andrade, C. A. (2016). Decomposição de palha de cana-de-açúcar recolhida em diferentes níveis após a colheita mecânica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(9), 1492-1500.
- Reis, V. M., & Teixeira, K. D. S. (2005). Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 151-80.
- Robertson, F. A.; Thorburn, P. J. Decomposition of sugarcane harvest residue in different climatic zones. *Australian Journal of Soil Research*. 2007: 45, 1–11.
- Sala, V.M.R., Freitas, S.D., and da Silveira, A.P.D., 2007, Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacterial in wheat plants. *Pesq. Agro. Bras.* 42: 1593-1600.
- Salton, J. C., Mielniczuk, J., Bayer, C., Boeni, M., Conceição, P. C., Fabrício, A. C., ... & Broch, D. L. (2008). Agregação e estabilidade de agregados do solo em sistemas agropecuários em Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32(1).
- Santiago, W. R., Vasconcelos, S. S., Kato, O. R., Bispo, C. J. C., Rangel-Vasconcelos, L. G. T., & Castellani, D. C. (2013). Nitrogênio mineral e microbiano do solo em sistemas agroflorestais com palma de óleo na Amazônia oriental. *Acta Amazonica*, 43(4).
- Santos, Danielle Gonçalves dos. Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Santos, H. D., JACOMINE, P. K. T., Anjos, L. D., Oliveira, V. D., Oliveira, J. D., COELHO, M. R., ... & Cunha, T. D. (2006). Sistema brasileiro de classificação de solos.

- Santos, H. L.; VASCONCELOS, C. A.; FRANÇA, G. E. Correção e Adubação dos solos – ENXOFRE. *Inf. Agropec. Belo Horizonte*, 7 (81). Setembro de 1981.
- Schultz, N., Lima, E., Pereira, M. G., & Zonta, E. (2010). Residual effects of nitrogen, potassium and vinasse, fertilization on cane plant and ratoon harvested with and without straw burning. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(3), 811-820.
- Segnini, A., Carvalho, J. L. N., Bolonhezi, D., Milori, D. M. B. P., Silva, W. T. L. D., Simões, M. L., ... & Martin-Neto, L. (2013). Carbon stock and humification index of organic matter affected by sugarcane straw and soil management. *Scientia Agricola*, 70(5), 321-326.
- Silva Ferreira, Joilson; Ivo Baldani, José; Divan Baldani, Vera Lúcia. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 32, n. 1, 2010.
- Silva, João Alfredo Neto da. Atributos químicos, físicos e agrônômicos de cana-soca submetida a níveis de palhiço. Tese (Doutorado). Dourados – MS: Universidade Federal da Grande Dourados; 2015.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., & Shrivastava, A. K. (2008). Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 667-673.
- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Grisi, B.M.; Hungria, M. & Araujo, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília, EMBRAPA-SPI/ CNPAF, 1994. 142p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 45)
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., & Zuberer, D. A. (Eds.). (2005). *Principles and applications of soil microbiology*(No. QR111 S674 2005). Upper Saddle River, NJ:: Pearson Prentice Hall.
- Thorburn, P. J.; Meier, E. A.; Collins, K.; Robertson, F. A. Changes in soil carbon sequestration, fractionation and soil fertility in response to sugarcane residue retention are site-specific. *Soil & Tillage Research* 120 (2012) 99–111.
- Valdrighi, M. M., Pera, A., Agnolucci, M., Frassinetti, S., Lunardi, D., & Vallini, G. (1996). Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass

- production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 58(2-3), 133-144.
- Vessey, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.
- Vitousek, P. M., Menge, D. N., Reed, S. C., & Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130119.
- Vitti, A. C., Trivelin, P. C. O., Cantarella, H., Franco, H. C. J., Faroni, C. E., Otto, R., ... & Tovajar, J. G. (2008). Mineralização da palhada e crescimento de raízes de cana-de-açúcar relacionados com a adubação nitrogenada de plantio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32(spe), 2757-2762.
- Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., & Champreda, V. (2010). Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(6), 283-290.
- Yamaguchi, Carina Sayuri. Decomposição da palha de cana-de-açúcar em função da quantidade aportada e da aplicação de vinhaça. 2015. Tese de Doutorado. Instituto Agrônômico.
- Yamaguchi, S. C., Ramos, N. P., Silva Carvalho, C., Moreno Pires, A. M., & de Andrade, C. A. (2017). Decomposição da palha de cana-de-açúcar e balanço de carbono em função da massa inicialmente aportada sobre o solo e da aplicação de vinhaça. *Bragantia*, 76(1).
- Zilli, J. É., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R., da Costa Coutinho, H. L., & Neves, M. C. P. (2003). Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 20(3), 391-411.

APÊNDICES

Apêndice 1. Morfologia colonial e celular dos isolados bacterianos.

Isolado	Morfologia			Isolado	Morfologia			Isolado	Morfologia			Isolado	Morfologia		
	Cor	Colônia	Celular		Cor	Colônia	Celular		Cor	Colônia	Celular		Cor	Colônia	Celular
1	Bra.	Circular	Cocos	30	Tra.	Circular	Cocos	59	Cre.	Irregular	Bastões	87	Ama.	Irregular	Cocos
2	Bege	Circular	Cocos	31	Ama.	Circular	Bastões	60a	Ama.	Circular	Bastões	150	Bra.	Circular	Bastões
3	Bege	Circular	Cocos	32	Ama.	Circular	Bastões	60b	Bra.	Circular	Bastões	151	Ama.	Circular	Bastões
4	Ama.	Irregular	Bastões	33	Ama.	Circular	Bastões	61	Cre.	Circular	Cocos	152	Ama.	Irregular	Bastões
5	Ama.	Circular	Bastões	34	Tra.	Circular	Bastões	62	Tra.	Circular	Bastões	153	Bege	Irregular	Bastões
6	Bege	Circular	Cocos	35	Cre.	Irregular	Cocos	63	Cre.	Circular	Cocos	200	Rosa	Irregular	Bastões
7	Bra.	Irregular	Cocos	36	Ama.	Circular	Bastões	64	Cre.	Irregular	Bastões	200A	Rosa	Irregular	Bastões
8	Ama.	Circular	Bastões	37	Ama.	Circular	Bastões	65	Rosa	Circular	Bastões	200B	Ama.	Circular	Cocos
9	Ama.	Circular	Bastões	38a	Ama.	Irregular	Bastões	66	Bra.	Circular	Bastões	200C	Lar.	Irregular	Bastões
10	Bege	Circular	Bastões	38b	Ama.	Irregular	Bastões	67	Bra.	Circular	Bastões	201A1	Rosa	Circular	Bastões
11	Ama.	Irregular	Bastões	39	Lar.	Circular	Bastões	68	Lar.	Irregular	Bastões	201A2	Ama.	Circular	Cocos
12	Rosa	Circular	Bastões	40	Ama.	Circular	Bastões	69	Ama.	Circular	Bastões	201A3	Bra.	Circular	Bastões
13A	Ama.	Circular	Bastões	41	Ama.	Circular	Bastões	70	Tra.	Circular	Cocos	201B	Bege	Circular	Bastões
13B	Bra.	Irregular	Cocos	42	Bra.	Circular	Bastões	71	Lar.	Circular	Bastões	201B1	Rosa	Irregular	Cocos
13C	Bege	Irregular	Cocos	43	Cre.	Circular	Bastões	72	Rosa	Circular	Bastões	201B2	Bege	Irregular	Bastões
14	Ama.	Irregular	Bastões	44a	Ama.	Circular	Bastões	73	Ama.	Circular	Bastões	201C	Bra.	Irregular	Bastões
15	Ama.	Irregular	Bastões	44b	Cre.	Irregular	Cocos	74	Bege	Irregular	Bastões	202A	Ama.	Irregular	Cocos
16	Ama.	Circular	Bastões	45	Bra.	Circular	Cocos	75	Bege	Circular	Bastões	202B1	Ama.	Circular	Bastões
17	Ama.	Circular	Bastões	46	Cre.	Circular	Bastões	76	Ama.	Irregular	Cocos	202B2	Ama.	Circular	Cocos
18	Ama.	Irregular	Bastões	47	Cre.	Irregular	Bastões	77	Bege	Irregular	Cocos	202C	Bege	Circular	Cocos
19	Bra.	Circular	Cocos	48	Tra.	Circular	Bastões	78	Bege	Circular	Bastões	203A	Ama.	Circular	Cocos
20	Ama.	Circular	Cocos	49	Ama.	Circular	Bastões	79	Bra.	Circular	Bastões	203B	Ama.	Irregular	Bastões
21	Bege	Circular	Bastões	50	Bra.	Circular	Cocos	80	Bra.	Circular	Cocos	203C	Bege	Irregular	Bastões
22	Bege	Irregular	Bastões	51	Bra.	Circular	Cocos	81	Bra.	Circular	Bastões	204	Ama.	Circular	Coco
23	Ama.	Irregular	Cocos	52	Ama.	Circular	Bastões	82	Bege	Circular	Cocos	205A	Bra.	Circular	Bastões
24	Ama.	Irregular	Bastões	53	Tra.	Irregular	Bastões	83	Ama.	Irregular	Cocos	205B	Bra.	Circular	Cocos
25	Cre.	Irregular	Bastões	54	Bra.	Irregular	Cocos	84	Tra.	Circular	Cocos	205C	Lar.	Circular	Cocos
26	Ama.	Irregular	Bastões	55	Cre.	Circular	Bastões	85	Ama.	Circular	Bastões	206	Bra.	Circular	Cocos
27	Ama.	Circular	Bastões	56	Ama.	Circular	Bastões	86	Bege	Irregular	Bastões	206I	Bege	Circular	Cocos
28	Bra.	Irregular	Bastões	57	Ama.	Irregular	Bastões	86a	Bra.	Irregular	Bastões				
29	Cre.	Irregular	Cocos	58	Cre.	Circular	Bastões	86b	Bege	Circular	Bastões				

Apêndice 2. Caracterização morfológica dos isolados fúngicos selecionados e indentificação preliminar.

Isolado	Aspecto	Identificação morfológica*
42F	Marrom com borda clara	-
300	Verde com centro branco	penicillium
302	Marrom claro	aspergillus
351	Cinza com borda branca	penicillium
357	Amarelo aveludado	-
395	laranja com manchas rosadas	-
430	Cinza com borda clara	penicillium
433	verde escuro com borda clara	cladosporium
435	Marrom aveludado	-
461	centro roxo aveludado	-
476	Verde aveludada	-
503	Marrom bordo branco	aspergillus

*Identificação preliminar com base em aspectos morfológicos.

Apêndice 3. Isolados bacterianos obtidos a partir do isolamento. L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio mais intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo 0-5 cm de profundidade, cultivado com cana-de-açúcar; S2: Solo 5-10 cm de profundidade cultivado com cana-de-açúcar; SR1: Solo de Referência 0-5 cm; SR2: Solo de Referência 5-10 cm.

Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem
1	S1	24	L1	47	L1	71	L1	200B	L2
2	L1	25	L1	48	L1	72	L2	200C	L2
3	L2	26	S1	49	L2	73	L2	201A1	L1
4	L1	27	L2	50	SR1	74	L1	201A2	L1
5	L1	28	L2	51	L2	75	L2	201A3	L1
6	L1	29	L1	52	L2	76	L1	201B	L1
7	L2	30	L1	53	L2	77	L1	201B1	L1
8	L2	31	L1	54	L1	78	L2	201B2	L1
9	L2	32	L1	55	L1	79	L2	201C	L1
10	L1	33	L1	56	SR2	80	L1	202A	L2
11	L2	34	L2	57	L2	81	L2	202B1	L2
12	S1	35	SR1	58	L1	82	L2	202B2	L2
13A	L1	36	SR1	59	L1	83	L2	202C	L2
13B	L1	37	L2	60a	L1	84	L2	203A	L1
13C	L1	38a	S1	60b	L1	85	L2	203B	L1
14	L1	38b	S1	61	L2	86	SC2	203C	L1
15	L1	39	SR2	62	SR2	86a	L1	204	S1
16	L1	40	SR1	63	SR2	86b	L1	205A	L2
17	L1	41	L2	64	L2	87	L2	205B	L2
18	L2	42	L2	65	L2	150	S1	205C	L2
19	L2	43	L1	66	L1	151	S1	206	SR2
20	L1	44a	S2	67	L1	152	S1	206I	SR2
21	L1	44b	S2	68	L2	153	S1		
22	L1	45	L2	69	L1	200	L2		
23	L1	46	L2	70	L2	200A	L2		

Apêndice 4. Isolados fúngicos obtidos a partir do isolamento. L1: Palha fresca; L2: Palha em estágio mais intermediário-avançado de decomposição; S1: Solo 0-5 cm de profundidade, cultivado com cana-de-açúcar; S2: Solo 5-10 cm de profundidade cultivado com cana-de-açúcar; SR1: Solo de Referência 0-5 cm; SR2: Solo de Referência 5-10 cm.

Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem	Isolado	Origem
42F	L2	327	S1	355	SR1	383	S1	411	L1	439	L1	467	S1	495	S1
300	L1	328	L1	356	SR1	384	S1	412	L1	440	L1	468	S1	496	S1
301	L1	329	S2	357	S1	385	S1	413	S2	441	SR2	469	SR1	497	S2
302	S1	330	S2	358	SR1	386	S1	414	S2	442	SR2	470	S2	498	S2
303	S1	331	SR1	359	L1	387	L1	415	S2	443	SR1	471	S2	499	S2
304	L2	332	L1	360	L1	388	L1	416	S2	444	L2	472	S2	500	SR1
305	L1	333	L1	361	L1	389	SR1	417	L1	445	L2	473	S1	501	SR1
306	S2	334	SR1	362	L1	390	S2	418	L1	446	SR1	474	S1	502	SR1
307	S2	335	S1	363	L1	391	S2	419	L1	447	SR1	475	S1	503	SR1
308	L2	336	L1	364	S2	392	SR2	420	SR1	448	L2	476	S1	504	L2
309	SR1	337	L2	365	S2	393	S2	421	L2	449	SR1	477	S1	505	L2
310	SR2	338	S2	366	S2	394	S1	422	L2	450	SR1	478	S1	506	L2
311	L1	339	S2	367	S2	395	S2	423	L1	451	L1	479	L2	507	S1
312	L1	340	L2	368	S2	396	L2	424	L1	452	L1	480	L2	508	S1
313	L1	341	L2	369	S2	397	S1	425	S1	453	SR1	481	L2	509	S1
314	L1	342	S2	370	S2	398	L2	426	S1	454	L2	482	SR2	510	S1
315	L1	343	S2	371	S1	399	L2	427	S1	455	L2	483	SR2	511	S1
316	S2	344	L1	372	S1	400	L2	428	S1	456	L2	484	SR2	512	L2
317	S2	345	S1	373	S1	401	SR1	429	S1	457	L2	485	SR2	513	S2
318	S2	346	S2	374	S1	402	S2	430	L2	458	L2	486	S2	514	SR1
319	S2	347	L1	375	S1	403	S2	431	L2	459	S1	487	S2	515	L1
320	S1	348	L1	376	S1	404	S2	432	L2	460	S2	488	S2	516	L1
321	S1	349	SR2	377	S1	405	L1	433	SR1	461	L2	489	S2	517	S2
322	L1	350	SR2	378	S1	406	L1	434	S1	462	L2	490	L2	518	S2
323	L1	351	L2	379	S1	407	SR1	435	S1	463	SR1	491	L2	519	S2
324	S2	352	L1	380	S1	408	SR1	436	S1	464	L2	492	L2	520	S2
325	S1	353	SR2	381	S1	409	SR1	437	S1	465	S1	493	S1	521	L2
326	S1	354	L1	382	S1	410	L1	438	S1	466	S1	494	S1		