

## Modelo conexionista aplicado à definição de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade do solo em sistemas de produção de cana-de-açúcar<sup>(1)</sup>.

**Acácio Aparecido Navarrete<sup>(2)</sup>; Lucas Palma Perez Braga<sup>(3)</sup>; Tatiana Rosa Diniz<sup>(3)</sup>; Raffaella Rossetto<sup>(4)</sup>; Siu Mui Tsai<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

<sup>(2)</sup> Pós-Doutorando; Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP); Piracicaba, SP; [acacionavarrete@gmail.com](mailto:acacionavarrete@gmail.com); <sup>(3)</sup> Bolsista de Treinamento Técnico (TT-3) da FAPESP; Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA, USP; [lucaspbb@hotmail.com](mailto:lucaspbb@hotmail.com), [tatyeco@gmail.com](mailto:tatyeco@gmail.com); <sup>(4)</sup> Pesquisadora Científica VI; Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA – Pólo Regional Centro Sul); Piracicaba, SP; [raffaella@apta.sp.gov.br](mailto:raffaella@apta.sp.gov.br); <sup>(5)</sup> Professora Titular; Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA, USP; [tsai@cena.usp.br](mailto:tsai@cena.usp.br)

**RESUMO:** A definição e monitoramento de parâmetros de qualidade do solo são fundamentais para a produção primária sustentável de matéria-prima utilizada em processos industriais de base biológica. Nesse sentido, a análise integrada de parâmetros biológicos, químicos e físicos do solo pode permitir avaliar com maior sensibilidade os potenciais impactos de tais processos de produção sobre o estado de qualidade de um solo. Propomos neste trabalho um modelo de integração de dados apoiado em conhecimentos da neurociência computacional, e dividido em cinco grandes módulos: (i) “comunidade microbiana”, contemplando dados taxonômicos obtidos em larga escala para as comunidades bacterianas e fúngicas do solo via métodos moleculares (sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA e 18S rRNA); (ii) “metagenômica funcional”, encerrando medidas de diversidade genética funcional de grupos microbianos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos do C e N (dados de sequenciamento em larga escala e qPCR); (iii) “solo”, contemplando parâmetros químicos e físicos do solo; (iv) “atmosfera” com dados de temperatura, precipitação e fluxo de gases do efeito estufa a partir do solo; e (v) “sistema de manejo” englobando diferentes sistemas de produção de cana-de-açúcar. O foco maior do modelo é nas interações entre esses compartimentos: por exemplo, como grupos microbianos específicos presentes no solo (por exemplo, subgrupos de *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*) (módulo “comunidade microbiana”) e genes funcionais microbianos (módulo “metagenômica funcional”) correlacionam com a emissão de gases do efeito estufa a partir do solo (módulo “atmosfera”) e parâmetros químicos e físicos do solo (módulo “solo”) em sistemas de produção de cana-de-açúcar (módulo “sistema de manejo”)?

**Termos de indexação:** correlações numéricas, microbiota do solo, bioinformática.

## INTRODUÇÃO

Os modelos conexionistas têm constituído ao longo dos últimos anos uma área de pesquisa de grande interesse e aplicação frente à necessidade de integração de dados provenientes de fontes de distinta natureza. Tais modelos podem ser caracterizados como dispositivos matemáticos e computacionais com habilidades de agrupar, organizar e integrar dados nos quais a operação matemática é baseada em correlação numérica (Link et al., 2008).

A análise integrada de parâmetros biológicos, químicos e físicos do solo pode auxiliar na definição de parâmetros relevantes para avaliar o *status* de qualidade de um solo. Entende-se por qualidade do solo, a sua capacidade, dentro dos limites de seu ecossistema natural ou manejado, de sustentar a produtividade de plantas e animais, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar, garantindo a saúde e permitindo a habitação humana (Doran & Parkin, 1994). Nesse sentido, a finalidade da avaliação da qualidade do solo é fornecer informação necessária para proteger e melhorar a longo prazo, a produtividade agrícola, a qualidade da água e os *habitats* de todos os organismos, incluindo as pessoas.

Embora haja consenso entre pesquisadores e produtores agrícolas de que a manutenção/melhoria da qualidade do solo é um elemento-chave para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a avaliação dessa qualidade não é uma tarefa fácil. A multiplicidade de fatores químicos, físicos e biológicos que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações em função do tempo e espaço, aliadas à complexidade do solo, estão entre os fatores que dificultam a capacidade de acessar a sua qualidade e identificar parâmetros-chave que possam servir como indicadores do seu funcionamento sob condições ambientalmente sustentáveis.

Os microrganismos, juntamente com a fauna

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

Neste trabalho é ilustrada a aplicação de um modelo conexionista baseado na integração de parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo e no fluxo de emissão de óxido nitroso ( $N_2O$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e metano ( $CH_4$ ) a partir do solo, visando, assim, a seleção de indicadores microbiológicos para a avaliação da qualidade do solo sob sistemas de produção de cana-de-açúcar adotados na atualidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo de caso foi considerado neste trabalho para ilustrar a aplicação de um modelo conexionista baseado em redes para integração de parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo sob diferentes sistemas de produção de cana-de-açúcar.

### Estudo de caso

Em abril de 2013 foi instalado um experimento em vasos de polietileno com capacidade de  $0.1\text{ m}^3$  mantidos em casa-de-vegetação no Pólo Regional Centro-Sul da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA), Piracicaba, SP. Para tanto, utilizou-se amostras da camada de 0-20 cm de um solo Podzólico Vermelho-Escuro de textura franco-argilosa coletadas na Fazenda Areão, pertencente à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP), Piracicaba, SP.

Seis tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada vaso foi preenchido com 90 Kg de solo. A adubação constou de uma dose de P (150

Kg  $ha^{-1}$  de  $P_2O_5$  como superfosfato triplo) e de  $K_2O$  como cloreto de potássio. Os tratamentos foram constituídos por duas condições de cobertura da superfície do solo: adição ou não de  $10\text{ t }ha^{-1}$  de palha de cana-de-açúcar, obtida da mesma variedade em campo, aplicação ou não de N (ureia) ( $60\text{ Kg }ha^{-1}$  de N) em sub-superfície (camada de 5-10 cm) e vinhaça ( $120\text{ m}^3\text{ }ha^{-1}$ ) em superfície. A dose de vinhaça utilizada foi definida em conformidade à norma CETESB P4.231 de dezembro de 2006. No total foram constituídos seis diferentes tratamentos, os quais representam sistemas de produção de cana-de-açúcar atuais no estado de São Paulo. Depois do preenchimento dos vasos e estabelecimento dos tratamentos, procedeu-se o plantio de cana-de-açúcar, variedade CTC 2, considerando um total de dez mudas por vaso. As mudas de cana-de-açúcar utilizadas foram provenientes de cultura de tecido e produzidas pela biofábrica do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). A umidade volumétrica do solo foi mantida a 20%.

### Parâmetros do solo

Parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo têm sido analisados no âmbito do experimento descrito.

Parâmetros microbiológicos: (1) Via métodos convencionais: enzimas do solo (urease, nitrato redutase, protease, celulase, beta-glucosidase, hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) e fosfatase ácida) e biomassa microbiana do C e N. (2) Via métodos moleculares: Avaliação taxonômica e funcional da comunidade bacteriana e fúngica do solo com o uso de tecnologias de sequenciamento de nova geração (sequenciamento em larga escala).

Parâmetros químicos: macro e micronutrientes, relação C:N, C total, N total, matéria orgânica, pH,  $CaCl_2$ , P, H+Al e os cálculos SB, CTC e V%.

Parâmetros físicos: densidade, porosidade, compactação, umidade, teores de areia, silte e argila.

O fluxo de emissão de  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  também tem sido quantificado a partir do solo utilizando câmaras estáticas e coleta de amostras de gases acumulados interiormente à câmara durante o período médio de 60 min (1, 20, 40 e 60 min após o fechamento da câmara). Amostras têm sido analisadas por cromatografia gasosa utilizando o equipamento SRI 8610C.

### Bioinformática e análise estatística

Os resultados obtidos com as análises

selecionadas para abordar os parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo podem ser analisados e interpretados conjuntamente aos valores da quantificação do fluxo de  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  a partir do solo (**Figura 1**). Neste sentido, um modelo conexionista de interações baseado em redes artificiais é capaz de explorar propriedades matemáticas, estatísticas e estruturais de diferentes grupos bacterianos e de fungos e fatores ambientais e as interações entre eles. Para tanto, coeficientes de correlação (*Spearman*) são calculados para diferentes combinações dos dados que integram os módulos “comunidade microbiana”, “metagenômica funcional”, “solo”, “atmosfera” e “sistemas de manejo” usando o pacote *multtest* do programa R (versão 2.6.0, *The R Foundation for Statistical Computing*). Diferentes níveis de significância estatística ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$ ,  $P < 0,005$ ) são considerados para testar a construção das redes artificiais de inter-relações. Para a configuração das redes, a topologia (número de camadas, unidades em cada camada, etc), parâmetros do algoritmo de treinamento e funções de ativação são determinadas (Brandes, 2001; Blondel, 2008). Após treinamento das redes, as mesmas são integradas aos diferentes módulos da aplicação e analisadas usando o programa *Gephi* (Bastian et al., 2009), o qual dispõe de interface gráfica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em duas sub-seções. A primeira, intitulada “Dados de distinta natureza”, apresenta uma visão geral da natureza dos dados obtidos (preliminares) e esperados no âmbito do estudo de caso anteriormente descrito. A segunda, intitulada “Modelo conexionista baseado em rede de interações”, ilustra a aplicação de um modelo conexionista baseado em rede de interações capaz de integrar os dados que se espera obter ao analisar os parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo, além da emissão de  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  a partir do solo conforme descrito na seção “Material e Métodos”.

### Dados de distinta natureza

A análise granulométrica do solo utilizado para estabelecimento do experimento em casa-de-vegetação revelou 30% de areia, 8% de silte e 62% de argila neste solo.

Análise química de amostras de solo coletadas 1 dia após os diferentes tratamentos terem sido constituídos foi capaz de detectar elevações no pH

e nos teores de potássio e enxofre do solo decorrentes da adição de vinhaça (**Tabela 1**). Neste tempo inicial de amostragem do solo não foram detectadas diferenças significativas com base nos valores obtidos para macro e micronutrientes, H+Al e os cálculos SB, CTC e V%.

**Tabela 1** – Valores de pH, enxofre e potássio conforme definidos para as amostras de solo coletadas 1 dia após o estabelecimento dos diferentes tratamentos em casa-de-vegetação.

Tratamentos	Atributos do solo*		
	pH	S	K
N0	5,2±0,1	6±1	1,2±0,1
N0+Palha	5,2±0,1	12±2	1,6±0,2
N60	5,2±0,2	12±1	1,1±0,1
N60+Palha	5,1±0,1	7±2	1,2±0,1
N60+Vinhaça	5,6±0,1	174±10	10,8±1,0
N60+Vinhaça+Palha	5,4±0,1	68±6	5,0±0,2

\*Média e desvio padrão calculados a partir de três réplicas de solo.

O fluxo de emissão de  $N_2O$  e  $CO_2$  dos 30 dias iniciais de experimentação foi maior em solo coberto com palha de cana-de-açúcar em todos os tratamentos analisados, com valor máximo acumulado de 3,2 mg  $N-N_2O$   $m^{-2}$  e 3,0 g  $C-CO_2$   $m^{-2}$  em solo sob adição de ureia e vinhaça.

É esperado detectar com as análises microbiológicas e bioquímicas propostas a ocorrência e frequência de grupos taxonômicos bacterianos e fúngicos presentes no solo sob os diferentes sistemas de produção de cana-de-açúcar, além de discriminar variações na biomassa microbiana e na detecção de enzimas do solo. Espera-se, também, identificar genes funcionais microbianos tais como aqueles relacionados aos ciclos do nitrogênio (nitrificação, desnitrificação e fixação de nitrogênio – *amoA*, *niifH*, *nosZ*, *norB*, *nirK* e *narG*) e carbono (*chiA*, *pmoA* e *mcrA*) com potencial uso como bio-indicadores funcionais associados a parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo. Navarrete et al (2013) mostraram que membros do filo *Acidobacteria* (ao nível taxonômico de classe) se correlacionaram com atributos químicos do solo e responderam ao manejo agrícola para produção de soja no estado do Mato Grosso, Brasil. Estes resultados abrem possibilidades de explorar subgrupos de *Acidobacteria* como potenciais bio-indicadores para avaliar a qualidade de solos tropicais sob manejo agrícola.

Os resultados das análises químicas e físicas do solo referente ao tempo inicial de amostragem e o fluxo de emissão de  $N_2O$  e  $CO_2$  nos 30 dias iniciais de experimentação ilustram a natureza dos dados



capaz de compor os módulos “solo”, “sistema de manejo” e “atmosfera”.

### Modelo conexcionista baseado em rede de interações

Um modelo conexcionista baseado em rede artificial de interação foi hipoteticamente definido para ilustrar a capacidade de integrar os dados de distinta natureza obtidos e esperados no âmbito do estudo de caso utilizado neste trabalho (**Figura 2**).

Devido ao fato das redes artificiais terem sido inspiradas originalmente em exame das estruturas do cérebro, em particular do exame de neurônios, é possível fazer uma analogia entre a sua estrutura e a estrutura do cérebro. Os neurônios são compostos por um corpo celular (soma), ramificações que recebem as entradas (dendritos) e por um prolongamento (axônio) que transmite os sinais do corpo celular. As extremidades do axônio são conectadas com dendritos de outros neurônios pelas sinapses, formando grandes redes. Por sua vez, a computação por rede artificial é realizada por uma malha de nós conectados. A ligação entre dois nós determina o caminho para o fluxo de informação. Por sua vez, a força de conexão entre dois nós é determinada por pesos sinápticos e a conectividade da rede é determinada por sua topologia. Na rede artificial ilustrada na **figura 2** os nós representam parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo, além do fluxo de emissão de  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  a partir do solo. O tamanho dos nós é definido em função do número de conexões que cada parâmetro estabeleceu com outros constituintes da rede. Por sua vez, as conexões resultam de correlações (positivas e negativas) previamente calculadas entre os diferentes parâmetros analisados. As diferentes cores dos nós ilustram os diferentes níveis de hierarquia (módulos), os quais representam agrupamentos de redes definidos a partir de parâmetros com maior correlação entre eles. Assim sendo, a seleção de parâmetros microbiológicos para avaliação da qualidade do solo a partir deste modelo de organização e integração de dados leva a indicação de grupos bacterianos e fúngicos com máxima correlação/interação com outros parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo ou com parâmetros convencionais para avaliação da qualidade do solo. A seleção de parâmetros para a avaliação da qualidade do solo sob diferentes sistemas de produção de cana-de-açúcar, implica, por sua vez, a interpretação de redes artificiais construídas separadamente para cada sistema de manejo do solo.

## CONCLUSÕES

Modelos conexcionistas baseados em redes artificiais de interação auxiliam na integração de dados de distinta natureza, tais como aqueles obtidos ao analisar parâmetros biológicos, químicos e físicos do solo.

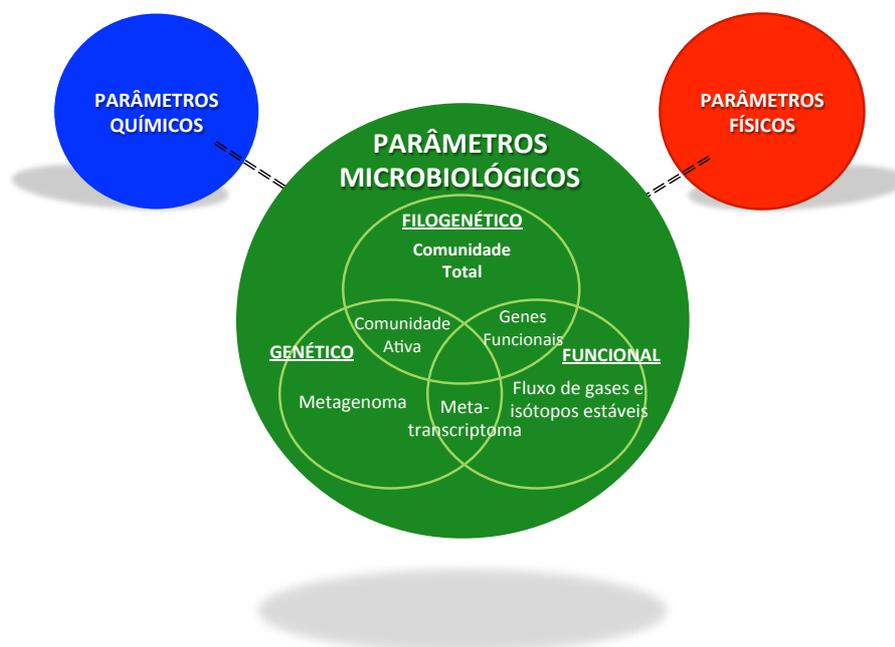
A definição de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade do solo pode ser feita a partir da seleção de nós da rede artificial com máxima conectividade com outros ou com indicadores tradicionais de qualidade do solo. Esses métodos já estão sendo adotados quando se propõe a elevação da produtividade das culturas, com o objetivo de integrar dados para redução dos custos de produção, a diminuição dos riscos de contaminação dos solos por insumos e aumento da sustentabilidade, integrando, assim, uma planilha do sistema denominado agricultura de precisão.

## AGRADECIMENTOS

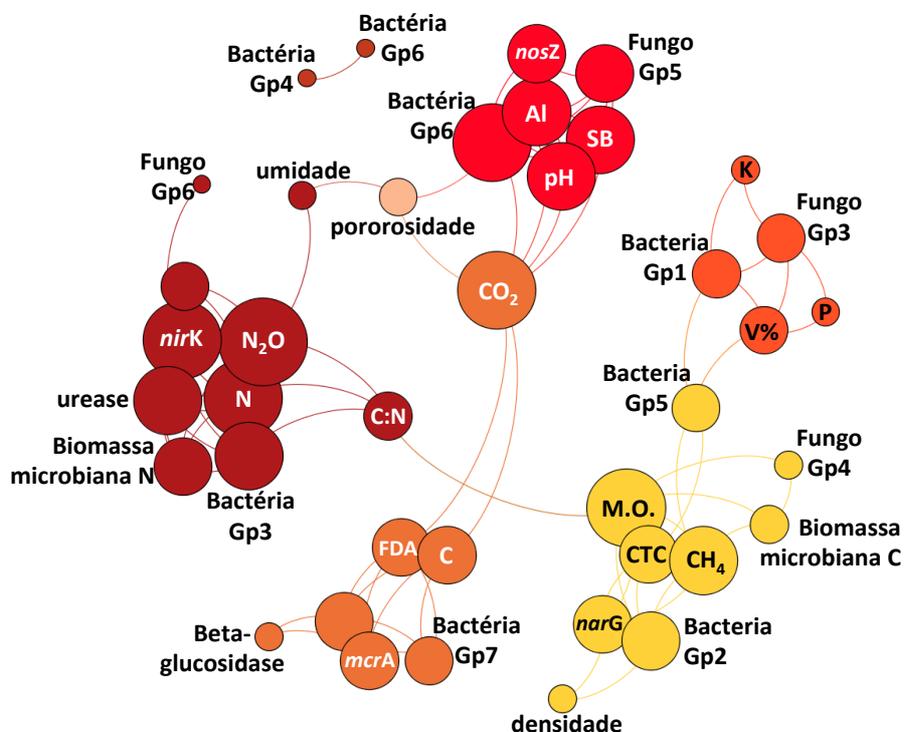
Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos FAPESP 2012/13321-7 e FAPESP/BE-BASIC 2011/51749-6.

## REFERÊNCIAS

- BASTIAN, M.; HEYMANN, S. et al. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. International AAAI Conference on Weblogs and Social Media. San Jose, California, USA, 2009.
- BLONDEL, V.D.; GUILLAUME, J-L. et al. Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics*, 2008, p. 10008.
- BRANDES, U. A Faster Algorithm for Betweenness Centrality. *Journal of Mathematical Sociology*, 25: 163-177, 2001.
- DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.107-124.
- LINK, J.; OVERHOLTZ, W.; O'REILLY, J. et al. The Northeast U.S. continental shelf Energy Modeling and Analysis exercise (EMAX): Ecological network model development and basic ecosystem metrics. *Journal of Marine Systems*, 74: 453-474, 2008.
- NAVARRETE, A.A.; KURAMAE, E.E. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 83:607-621, 2013.



**Figura 1** – Diagrama representativo da integração de parâmetros químicos, físicos e biológicos do solo. Esta ilustração tem sua base fundamentada nos parâmetros microbiológicos e destaca algumas medidas das dimensões da diversidade microbiana no solo.



**Figura 2** – Rede artificial de interação de parâmetros microbiológicos, químicos e físicos do solo e valores de quantificação da emissão de  $N_2O$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  a partir do solo. FDA, hidrólise do diacetato de fluoresceína. SB, soma de bases. CTC, capacidade de troca catiônica. V%, saturação da CTC por bases. C:N, relação Carbono:Nitrogênio. M.O., matéria orgânica. Gp, grupo taxonômico.