

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Potencial desnitrificador de estirpes de *Bradyrhizobium*
recomendadas para a cultura da soja

Elisamara Caldeira do Nascimento

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

Elisamara Caldeira do Nascimento

Sob a Orientação do Professor
Segundo Urquiaga

e Co-Orientação do Professor
Robert Michael Boddey

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – FITOTECNIA**

ELISAMARA CALDEIRA DO NASCIMENTO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/ 12 / 2011

Segundo Urquiaga. Ph. D. Embrapa Agrobiologia.
(Orientador)

Jean Luis Simões de Araújo – Dr. Embrapa Agrobiologia

Jorge Jacob Neto – Ph D. UFRRJ



633.34894

N244p

T

Nascimento, Elisamara Caldeira do,
1985-

Potencial desnitrificador de
estirpes de Bradyrhizobium
recomendadas para a cultura da soja
/ Elisamara Caldeira do Nascimento -
2011.

xv, 62 f.: il.

Orientador: Segundo Urquiaga.

Dissertação (mestrado) -

Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 50-62.

1. Soja - Adubos e fertilizantes
- Teses. 2. Soja - Inoculação -
Teses. 3. Rizóbio - Teses. 4.
Nitrogênio - Fixação - Teses. 5.
Óxido nitroso - Teses. I. Urquiaga
Caballero, Segundo Sacramento,
1950-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Fitotecnia. III.
Título.

*“E apliquei o meu coração a esquadrihar, e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; esta enfadonha ocupação deu Deus aos homens, para nelas os exercitar. Porque na muita sabedoria há muito enfado; e o que aumentar em ciência, aumenta em trabalho.”
(Eclesiastes 01, versos 13 e 18)*

À minha mãe Marly, e minha irmã Flávia, amigas e companheiras em todos os momentos,

Ao Gláucio, que com muita paciência e amor sempre me apoiou,

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom Deus por toda a experiência que tem me permitido passar e por demonstrar sua presença em minha vida em todos os momentos.

Aos meus pais Marly e Durvalino e minha irmã Flávia que sempre se dedicaram e procuraram fazer o melhor por mim e que sem o apoio eu não estaria realizando mais uma etapa de minha caminhada.

Ao Gláucio, por cuidar do meu coração!Agradeço também pelos conselhos, apoio, dedicação e por me transmitir sua experiência científica e acadêmica.

A Dona Eliza, Patrícia e Valério pela compreensão e carinho que sempre tiveram comigo, mesmo nos momentos mais complicados.

Aos meus orientadores, Dr. Segundo Urquiaga, Dr. Robert Michael Boddey pelo apoio, crítica, orientação, ajuda e conselhos que muito contribuíram na minha reflexão e crescimento profissional.

Ao Dr. Bruno Alves pela paciência, atenção e dedicação que tem com seus orientados e em especial, a que teve comigo. Sua ajuda e colaboração foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao Dr. Jean Luiz de Simões Araújo por toda sua colaboração, apoio, conselhos, conversas e também por dividir comigo parte de todo seu conhecimento.

Aos meus grandes amigos de caminhada pessoal e profissional Anatoly Torres, Talita Matos e Jerusa Maia e Sá por quem tenho enorme admiração e carinho, por ter compartilhado os momentos tão difíceis nesta etapa da minha vida, obrigada por todas as risadas e todo afeto.

Aos amigos Prof. Zonta e Prof. Eduardo Lima, muito obrigada pelo incentivo, apoio, carinho e colaboração desde o início da vida acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Fertilidade da UFRRJ, Fábio, Fabiano, Erica, Claudinha, Rafael Presotto, por toda ajuda e companheirismo.

As amigas feitas na Universidade Rural e que levarei para sempre, Nicelle, Paula, Agata Keila, Carol, Natália, Ingrid e aquelas feitas ainda na adolescência, Núbia e Angelaine.

Aos funcionários da Embrapa, Tatiane Vidal, Claudinho, Monalisa, Roberto Grégio, Roberto Carlos, Sergio, Aurélio, Natália, Rosa, Fernanda, Naldo, Ernani, pelo auxílio e dedicação fundamentais para realização deste trabalho.

Aos amigos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Ciclagem de Nutrientes, Ana Paula, Caroline, Rafael Fiúsa, Fernando, Rangel, Abmael, Nivaldo, Débora e Carol, pela preciosa ajuda nas coletas de experimentos e pelos momentos de distração e auxílio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia pela possibilidade de realização do curso.

Muito Obrigada!!!

BIOGRAFIA

Elisamara Caldeira do Nascimento, filha de Marly Pereira Caldeira e Durvalino Pereira do Nascimento, nasceu em 19 de dezembro de 1985, na cidade de Guanhães, estado de Minas Gerais.

Em 2009 graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante sua graduação sempre esteve envolvida com estágios e projetos de pesquisa, sendo bolsista de Iniciação Científica pela Embrapa Solos na área de Fertilidade dos Solos e pela Embrapa Agrobiologia no laboratório de Ciclagem de Nutrientes na área de Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ em setembro de 2009, concluindo seu trabalho de dissertação de Mestrado na presente data.

RESUMO

NASCIMENTO, Elisamara Caldeira. **Potencial desnitrificador de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* recomendadas para a cultura da soja.** 2011. 61p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

A fixação biológica de N₂ (FBN) é fundamental para a nutrição da cultura de soja, existindo também indícios de que esse processo esteja relacionado à produção de N₂O no solo, um gás com alto potencial de efeito-estufa. O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a capacidade de produção de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium spp.*, recomendadas para a cultura da soja, e observar a presença ou ausência dos genes ligados a desnitrificação nestas mesmas bactérias. O estudo foi conduzido em três etapas. Na primeira, a técnica de amplificação do gene 16S rDNA foi testada para identificar as espécies de *Bradyrhizobium* que seriam utilizadas nos demais ensaios. Na segunda etapa, 12 estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*, crescidas em meio de cultura, foram incubadas em atmosfera livre de O₂, contendo ou não acetileno, após enriquecimento do meio com nitrato. Avaliou-se a produção de N₂O por cada estirpe. Nestas estirpes foi verificada a presença dos genes ligados a desnitrificação (*napA*, *nirK*, *norC*, e *nosZ*) utilizando reações de PCR. Em um segundo estudo, avaliou-se a produção de N₂O emitido pelo solo durante 63 dias após o plantio de soja em vasos utilizando-se sementes inoculadas, ou não, com estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* recomendadas para inoculantes comerciais. As plantas foram colhidas na floração, e os nódulos foram incubados em solução com nitrato em atmosfera livre de O₂, para avaliar a presença de intermediários do processo de desnitrificação. Outra parte dos nódulos colhidos foi incubada em atmosfera livre de O₂, contendo concentração conhecida de N₂O. A técnica de PCR utilizando iniciadores para o gene 16S rDNA possibilitou diferenciar as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*. Além disso, pela primeira vez as estirpes SMB1 e DF395 foram identificadas geneticamente como pertencentes à espécie *B. elkanii*. Em cultura pura as estirpes de *B. japonicum* produziram mais N₂O do que as estirpes de *B. elkanii*, especialmente na presença de acetileno. Entre as 12 estirpes testadas, todas as quatro estirpes de *B. japonicum* possuíam todos os genes necessários para a desnitrificação, que permitem a redução de nitrato até N₂, exceto a estirpe USDA06 que não possuía o gene *nosZ* que codifica a enzima N₂O-redutase. Para as estirpes de *B. elkanii*, apenas 29W e SM1b apresentam o gene *norC* (NO-redutase), sendo o gene *nosZ* também presente na estirpe 29W. No ensaio em vasos, as plantas de soja inoculadas com *B. japonicum* produziram mais N₂O do que as plantas inoculadas com *B. elkanii*. Dos nódulos dessas plantas, apenas aqueles resultantes da inoculação com a estirpe CPAC 7 apresentaram consumo de N₂O, em todas as repetições, quando incubados em atmosfera contendo N₂O. Não houve consistência nos resultados do ensaio com nódulos em meio com nitrato, pois se observou grande variação nas quantidades de nitrato, nitrito e N₂O entre as repetições, com indícios de que em algumas repetições parte dos nódulos poderia estar ocupada com estirpes nativas do solo diferentes das inoculadas. Concluiu-se que a capacidade de produzir N₂O seja mais comum às estirpes de *B. japonicum*, embora também ocorra em algumas estirpes de *B. elkanii*. Em condições favoráveis, a emissão de N₂O do solo plantado com soja deve ser maior em plantas inoculadas com estirpes de *B. japonicum*.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium sp.*, desnitrificação, soja.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Elisamara Caldeira. **Potential denitrifying strains of *Bradyrhizobium* sp. recommended for soybean.** 2011. 61p. Dissertation (Master of Plant Science) – Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2011.

The N₂ fixation (BNF) is essential for the nutrition of the soybean crop, and there is also evidence that this process is related to the production of N₂O in the soil, a gas with a high potential for greenhouse effect. The main objective of this study was to evaluate the ability of N₂O production by strains of *Bradyrhizobium* spp., recommended for the soybean crop, and observe the presence or absence of denitrification genes linked to these same bacteria. The study was conducted in three steps. At first, the technique of amplification of the 16S rDNA was tested to identify species of *Bradyrhizobium* that would be used in other tests. In the second step, 12 strains of *B. japonicum* and *B. elkanii*, grown in culture medium were incubated in O₂-free atmosphere containing acetylene or not, after enrichment of the culture medium with nitrate. The production of N₂O by each strain was evaluated. These same strains were tested for the presence of genes linked to denitrification (NapA, NirK, NorC, and NosZ) using PCR reactions. In a second study carried out in pots, the soil N₂O emission for 63 days after soybean planting using seeds inoculated or not with strains of *B. Japonicum* and *B.elkanii*, recommended for commercial inoculants was evaluated. Plants were harvested at flowering, and the nodules were incubated in solution with nitrate under an O₂-free atmosphere to assess the presence of intermediates of the denitrification process. Another portion of the harvested nodules was incubated in an atmosphere free from O₂, containing a known concentration of N₂O. The technique of 16S rDNA gene amplification was efficient to identify species of *B. japonicum* and *B. elkanii*, and for the first time the strains DF395 and SMB1 were genetically identified as belonging to the species *B. elkanii*. In pure culture, strains of *B. japonicum* produced more N₂O than strains of *B.elkanii*, especially in the presence of acetylene. Among the 12 strains tested, the four strains of *B. Japonicum* presented the whole set of denitrification genes responsible for the reduction of nitrate to N₂, except the strain USDA 06 which lacked the *nosZ* gene encoding the enzyme N₂O-reductase. For the strains of *B. elkanii*, only 29W and SM1b presented the gene *NorC* (NO-reductase), but the *nosZ* gene was also present in 29W. In the pot experiment, the soybean plants inoculated with *B. japonicum* produced more N₂O than plants inoculated with *B. elkanii*. Different from the other treatments, nodules resulting from the inoculation with strain CPAC 7 showed a consumption of N₂O in all repetitions, when incubated in an atmosphere containing N₂O. There was no consistency in the results when nodules were soaked in nitrate solution, as a great variation in the amounts of nitrate, nitrite and N₂O between repetitions was observed, with indications that in some repetitions the nodules could have been occupied with soil native strains different from the inoculated ones. It is concluded that the ability to produce N₂O is more common for strains of *B. japonicum*, although it also occurs in some strains of *B. elkanii*. Under favourable conditions, the N₂O emission from soil planted with soybeans should be greater in plants inoculated with strains of *B. japonicum*.

Keywords: *Bradyrhizobium* sp., denitrification, soybean.

ÍNDICES DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo do Nitrogênio (Adaptado de YE & THOMAS, 2001). | 12 |
| Figura 2. Rota metabólica e enzimas envolvidas no processo de desnitrificação. | 14 |
| Figura 3. Via de desnitrificação, com produtos solúveis e gasosos indicados, e os genes responsáveis por cada etapa do processo (Adaptado de ZUMFT, 2005). | 14 |
| Figura 4. Esquema da câmara utilizada para coleta do gás. | 26 |
| Figura 5. Amplificação de uma região do gene 16S rDNA de 12 estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> , utilizando iniciadores específicos. A) A combinação do primer Brady + BElk ; B) A combinação de Brady + BJap. O controle negativo, (branco na figura) foi a reação de PCR sem DNA. | 33 |
| Figura 6. Amplificação por PCR dos genes <i>napA</i> , <i>nirK</i> , <i>norC</i> e <i>nosZ</i> utilizando DNA genômico de 12 estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e os iniciadores específicos. Após a PCR, 5 µl foram aplicados no gel de agarose 2%. Coluna 1: Padrão de Peso Molecular 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen); Demais colunas representam as combinações de iniciadores utilizados: 2 (BJ <i>NapAF</i> + BJ <i>NapAR</i>); 3 (BJ <i>NirKF</i> + BJ <i>NirKR</i>); 4 (BJ <i>NorCF</i> + BJ <i>NorCR</i>); 5 (BJ <i>NosZF</i> + BJ <i>NosZR</i>); 6 (BJ <i>16SF</i> + BJ <i>16SR</i>). | 37 |
| Figura 7. Temperatura, precipitação e fluxo médio diário de N ₂ O nos tratamentos inoculados com estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (CPAC 15 E CPAC 7), <i>B. elkanii</i> (29 W e SEMIA 587), sem inoculação e sem planta. | 42 |
| Figura 8. Óxido nitroso acumulado emitido em 63 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student. As barras representam o erro padrão da média. | 43 |
| Figura 9. Consumo de nitrato, produção de nitrito, e emissão de N ₂ O pelos nódulos relativos a uma solução de Nitrato 10ppm | 46 |
| Figura 10. Consumo de N ₂ O por estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp.. Cada barra representa um dia de coleta. | 47 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> avaliadas no experimento. | 20 |
| Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> quanto à espécie..... | 21 |
| Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para avaliação da presença de genes ligados a desnitrificação em estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> | 23 |
| Tabela 4. Referências para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados..... | 24 |
| Tabela 5 . Resultado da análise química do solo antes da implantação do experimento. | 25 |
| Tabela 6. Valores das taxas de emissão de N ₂ O por estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii in vitro</i> , na presença ou ausência de acetileno. | 32 |
| Tabela 7. Presença dos genes relacionados com a desnitrificação no genoma de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> . Sinal positivo (+) indica presença e negativo (-) indica ausência de cada um dos genes. | 38 |
| Tabela 8. Acúmulo de matéria seca e nitrogênio total em parte aérea, e matéria fresca de nódulos de plantas de soja inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium sp.</i> | 39 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| °C | Grau Celsius |
| C:N | Relação Carbono Nitrogênio |
| CNPS | Centro Nacional de Pesquisa em Solos |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| Embrapa | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EtBr | Brometo de Etídio |
| FBN | Fixação Biológica de Nitrogênio |
| FN ₂ O | Fluxo de óxido nitroso |
| g | Grama |
| ha | Hectare (10000 m ²) |
| kb | Marcador de peso molecular |
| kPa | Quilopascal |
| Meio 79 | Meio de cultura seletivo utilizado para crescimento de bactérias |
| Mg | Megagrama (1000 Kg) |
| ml | Militro (10 ⁻³) |
| mM | Milimolar (10 ⁻³) |
| Mt | Milhões de toneladas |
| N ₂ O | Óxido nitroso |
| nm | Nanômetro |
| nmol/mol | Nanomol por mol |
| PAG | Potencial de aquecimento global |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| ppb | Partes por bilhão |
| ppm | Partes por milhão |
| rpm | Rotações por minuto |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| u | Unidades |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| YM | Meio de cultura rico (extrato de levedura e manitol) para o crescimento de rizóbio |
| µg | Micrograma (10 ⁻⁶) |
| µl | Microlitro (10 ⁻⁶) |
| µM | Micromolar (10 ⁻⁶) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. Estirpes de importância para inoculação da soja e levantamento taxonômico..... | 4 |
| 2.2. O Efeito Estufa e a Agricultura..... | 7 |
| 2.3. Método direto de avaliação do fluxo de gases do efeito estufa..... | 8 |
| 2.4. Análise por cromatografia gasosa..... | 10 |
| 2.5. Ciclo do Nitrogênio | 12 |
| 2.6. Emissão de N ₂ O e Fixação Biológica de Nitrogênio | 14 |
| 2.7. Utilização da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase)..... | 16 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. Estudo do potencial de desnitrificação de <i>Bradyrhizobium</i> , <i>in vitro</i> | 18 |
| 3.2. Amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA para diferenciar duas espécies de <i>Bradyrhizobium</i> ... 20 | |
| 3.2.1. Extração de DNA genômico | 20 |
| 3.2.2. Condições das reações de PCR..... | 21 |
| 3.2.3. Análise por eletroforese em gel de agarose | 21 |
| 3.3. Avaliação da presença de genes relacionados com a desnitrificação | 22 |
| 3.3.1. Condições das reações de PCR e eletroforese em gel de agarose | 24 |
| 3.4. Estudo em campo..... | 24 |
| 3.4.1. Material vegetal e condições de cultivo | 24 |
| 3.4.2. Amostragem e análise de gases | 25 |
| 3.4.3. Amostragem e análise de tecido vegetal..... | 27 |
| 3.4.4. Análise de consumo de N ₂ O pelos nódulos..... | 27 |
| 3.5. Análise de nitrito, nitrato e emissão de N ₂ O pelos nódulos incubados em solução de nitrato..... | 28 |
| 3.5.1. Preparo das amostras e análises..... | 28 |
| 3.5.2. Preparo das soluções..... | 28 |
| 3.5.3. Análises estatísticas | 29 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| 4.1. Estudo do potencial de desnitrificação de <i>Bradyrhizobium</i> , <i>in vitro</i> | 30 |
| 4.1.1. Emissão de N ₂ O por estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> <i>sp.</i> | 30 |
| 4.1.2. Amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA e diferenciação de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i> | 33 |
| 4.1.3. Amplificação dos genes relacionados à desnitrificação em estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> , e comparação com resultados de emissão de N ₂ O. | 35 |
| 4.2. Experimento em vasos | 38 |
| 4.2.1. Avaliação da matéria seca, N-total e peso fresco de nódulos de plantas de soja. .. | 38 |
| 4.2.2. Emissões de N ₂ O por plantas de soja. | 41 |
| 4.2.3. Consumo de nitrato, produção de nitrito, e emissão de N ₂ O pelos nódulos em solução. | 44 |
| 4.2.4. Análise de consumo de N ₂ O pelos nódulos..... | 46 |
| 5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 49 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 51 |

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja no Brasil é uma das principais *commodities* agrícolas, fato evidenciado pela dimensão da área cultivada, que faz do país o segundo produtor mundial de grãos dessa cultura. Na safra de 2011, a cultura da soja foi plantada em 23,8 milhões de hectares, com um rendimento (IBGE-LSPA) médio de 3,0 Mg ha⁻¹ totalizando 71,6 milhões de toneladas (Mt ou Tg) de grãos.

O elevado teor protéico dos grãos (cerca de 40%), associado à alta produtividade, faz com que a cultura da soja apresente uma alta demanda de N. Nas leguminosas, uma alternativa para o fornecimento de nitrogênio à planta se dá através do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo caracterizado pela associação da planta com bactérias coletivamente denominadas de rizóbios (BEZERRA, 1997; XAVIER, 2000; SANTOS et al., 2005), as quais podem ser utilizadas como biofertilizantes (OLIVEIRA ET AL., 2003; REIS, 2005; RUMJANEK et al., 2006) e no caso da soja, suprem quase que totalmente o N requerido pela planta (ALVES et al., 2003).

Contudo, sistemas agrícolas assumem um papel importante na emissão e absorção dos gases do efeito estufa e são responsáveis por aproximadamente um quinto do incremento anual dos gases com atividade radiativa para a atmosfera (Mosier et al., 2004; IPCC, 2006). Em geral, somente três gases do efeito estufa são produzidos pela agricultura: gás carbônico (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O), (Duxbury et al., 1994). Apesar de sua baixa concentração na atmosfera, o óxido nitroso (N₂O) é considerado um importante gás de efeito estufa devido à sua alta capacidade de absorver radiação infravermelha e sua alta estabilidade na atmosfera (Robertson & Grace, 2004)

Desde o período pré-industrial até fins dos anos 90 a concentração de óxido nitroso (N₂O) na atmosfera vem aumentando significativamente a uma taxa de 0,2 a 0,3% ao ano, (PRINN et al., 2004). Este processo tem sido atribuído a um aumento no uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura, retirada de áreas de floresta e aumento das queimadas no desmatamento (ROBERTSON, 2004). A fixação biológica de N₂ (FBN) é discutida como uma possível fonte de N₂O para a atmosfera, mas os dados empíricos diretos são escassos sobre isto. A presença de leguminosas pode estimular as emissões de N₂O aumentando a entrada de N no solo, fornecendo substratos adicionais para a nitrificação e desnitrificação (ROCHETTE et al., 2004), através da decomposição de seus resíduos. Os trabalhos de Rochette e Janzen et al (2005) demonstraram que no processo de FBN não ocorre emissão

sensível de N_2O , o que foi confirmado na Embrapa Agrobiologia (Alves et al, 2010). Como não existem resultados que relacionem diretamente a FBN com a emissão de N_2O do solo, o IPCC propôs que o fator de emissão dessa fonte de N fosse retirado da guia para elaboração de inventários nacionais (IPCC, 2006). GARCIA-PLAZAOLA (1993) concluiu que, mesmo em condições ótimas de desnitrificação e sob as mais altas populações de *Rhizobium* encontradas em solos agrícolas, a contribuição direta destes à desnitrificação total, foi insignificante se comparado com outros microrganismos do solo. Não obstante, a presença da leguminosa pode elevar as emissões de N_2O do solo indiretamente, em função da disponibilidade de N do solo através dos resíduos de colheita. De fato, as maiores emissões de N_2O geralmente têm sido medidas após a adição de resíduos com baixa relação C:N (BAGGS et al., 2000). Como estes resíduos se decompõem mais rapidamente, o Corgânico decomponível e o N disponível no solo aumentam.

Os organismos desnitrificantes são amplamente distribuídos entre os procariotos, e cada um têm uma combinação de enzimas (nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase, e óxido nitroso redutase), codificadas por genes específicos que reduzem óxidos de nitrogênio. Bactérias fixadoras de N_2 estão entre esses organismos, existindo diferenças em nível de espécie e estirpe, sendo de especial interesse aquelas associadas à soja (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a).

Desde a década de 70 diversos estudos mostram que as bactérias pertencentes ao gênero até então chamado de *Bradyrhizobium*, são diferentes fisiologica e morfologicamente. Desta forma em 1992, foi dividido em duas espécies: *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (DÖBEREINER et al.,1970; JORDAN, 1982; KUYKENDALL et al. ,1992). Contudo, o gênero *Bradyrhizobium sp.* é extremamente diverso, e quanto ao efeito na desnitrificação, o produto final (NO_2 , N_2O , N_2) parece depender essencialmente da estirpe estudada (SAMESHIMA-SAITO et al. 2006a). Mais ainda, SAMESHIMA-SAITO et al (2006b) mostraram que *B. japonicum* em raízes de soja poderiam consumir o N_2O da atmosfera próxima ao solo, funcionando como um dreno do gás. Em função de diferenças entre estirpes na capacidade de utilizar as formas oxidadas de N no solo, não se pode afirmar qual seriam os efeitos da utilização de plantas de soja que recebem inoculantes comerciais no Brasil.

Nesse sentido, atualmente é possível se conseguir resultados mais rápidos e confiáveis através da utilização de técnicas de biologia molecular quando comparado com métodos tradicionais (MORLONY et al., 2003). Uma das técnicas que vem substituindo os métodos fenotípicos de identificação é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a rápida

amplificação de um segmento específico de DNA, por meio da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para o gene de interesse além de um DNA molde (KONEMAM et al., 2001), permitindo avaliar a presença ou ausência de um gene em determinada amostra, ou diferenciar um grupo de organismos de outro.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi quantificar as emissões de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium* sp., recomendadas para a cultura da soja, crescidas em meio de cultura (*in vitro*) e em associação com plantas de soja em vasos, e observar a presença ou ausência dos genes ligados a desnitrificação nestas mesmas bactérias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estirpes de importância para inoculação da soja e levantamento taxonômico

Atualmente a soja é cultivada em mais de 23 milhões de ha (M ha) no Brasil, com um rendimento médio de 3000 kg de grãos por hectare. Esta cultura é a mais importante no país, tanto por apresentar a maior área plantada, mas também pela sua grande participação nas exportações brasileiras (CONAB, 2011).

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja. HUNGRIA et al. (1997) relataram que para uma produção de 2.400 kg ha⁻¹ de grãos de soja seriam necessários aproximadamente 200 kg de N ha⁻¹ derivados do ar.

Vale lembrar que devido à alta eficiência dos inoculantes nesta cultura, adubos nitrogenados geralmente não são aplicados à soja, sendo que o N necessário para esta cultura só pode então, ser obtido pelo aporte do solo e principalmente pelo processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Por outro lado, estudos mostram que a quantidade do N derivado da FBN é aproximadamente igual à quantidade do N exportado do campo na forma de grãos, assim a cultura não extrai quantidades significativas do N do solo (ALVES et al., 2003). Desta forma, tem-se hoje o desafio de aumentar a eficiência da FBN visando fundamentalmente aumentar a fertilidade nitrogenada dos solos agrícolas, pois, devido às condições citadas acima quase que a totalidade do N derivado da FBN está sendo exportado para os grãos, contribuindo pouco para o solo.

Recentemente, HERRIDGE et al. (2008) estimaram que a total contribuição da FBN à soja no Brasil soma 4,6 Tg (milhões de toneladas) de nitrogênio por ano. Em comparação, o total de N aplicado nos sistemas agropecuários do país, na forma de fertilizantes sintéticos, soma 2,3 Tg ano⁻¹ (FAOSTAT, 2008).

Este sucesso no cultivo da soja brasileira se deve em grande parte ao incentivo em pesquisas ocorrido a partir da década de 60. Com o apoio da pesquisadora Dra. Johanna Dobereiner foi implantado no Brasil o Programa Nacional de Pesquisa da Soja o Ensaio Nacional de variedades versus inoculantes, que posteriormente foi transformado para estudos de variedades versus estirpes de rizóbio e que contava com participação de grupos de pesquisa de todo o país. Com os resultados obtidos neste programa os melhoristas da soja foram convencidos a não usar adubação nitrogenada, mas sim inocular as sementes nos trabalhos de seleção de cultivares e melhoramento destas (FRANCO, 2009). Este fato foi imprescindível para que pudéssemos ter atualmente o cultivo de soja como conhecemos.

Estes pesquisadores brasileiros juntamente com pesquisadores da América Latina também foram responsáveis pela organização da primeira Reunião Latino-Americana sobre rizóbio (Relar), em 1964, que até hoje reúne bianualmente os estudiosos do tema nesse continente. Paralelo a este evento iniciaram a reunião brasileira de controle de qualidade de inoculante. Estes estudos e discussões foram fundamentais para a melhoria dos inoculantes oferecidos aos agricultores. A Relar e a Reunião Brasileira de controle de qualidade de inoculante, apoiadas inicialmente pelo manual “Root nodule bactéria” do professor J. M. Vincent, foram fundamentais para padronizar métodos, evoluir com pesquisas, gerar conhecimento e contribuir para o sucesso da inoculação da soja no Brasil (FRANCO, 2009). A grande interação dos pesquisadores brasileiros com laboratórios nos Estados Unidos, Inglaterra, Escócia, França e Austrália que já possuíam grande conhecimento sobre a inoculação com Rizóbios também deve ser destacada, pois além de conhecimento teórico, essa interação foi também responsável pela origem das estirpes de rizóbio usadas nos inoculantes para a soja brasileira. A base genética das estirpes utilizadas no Brasil se originam em estirpes trazidas nos inoculantes ou culturas puras dos Estados Unidos (várias estirpes SEMIA-RS e SMS-SP) e Austrália (CB1809), incluindo a estirpe BR 29, que foi isolada por José Roberto Rodrigues Perez no Rio de Janeiro, a partir de um nódulo produzido em uma planta de soja crescendo em solo da série Ecologia, que apresentava toxidez de manganês, mas que havia sido inoculada com uma estirpe com origem SEMIA (FRANCO, 2009).

A partir 1979, as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587, e depois de 1992, as SEMIA 5079 (CPAC 15) e a SEMIA 5080 (CPAC 7), foram incluídas na recomendação oficial de inoculantes comerciais indicados para a cultura da soja (JARDIM-FREIRE & VERNETTI, 1999; JARDIM-FREIRE et al, 2006). Em geral, o sucesso da FBN e da nodulação pode estar relacionado com as características das populações específicas de rizóbios existente no solo e com o teor de nitrogênio (N) mineral presente neste (HOLSTEN et al., 1971). Um exemplo são os solos do Cerrado que não possuíam estirpes de rizóbios capazes de nodular eficientemente a cultura da soja naquela região, devido a diversos fatores abióticos e bióticos que modificavam os padrões de competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium spp.*. Estirpes de baixa eficiência simbiótica pré existentes no solo interferiam no estabelecimento de outras estirpes, inoculadas através da semente, enquanto a ação de actinomicetos produtores de antibióticos, nativos nos solos de cerrado, alterava o percentual das populações de rizóbios resistentes (VARGAS et al., 1992; VARGAS et al. 1994). Por isso, a inoculação da cultura da soja com as estirpes resistentes atualmente

recomendadas de *Bradyrhizobium sp.* foi imprescindível para o bom desempenho da lavoura da soja nessa região (HUNGRIA & MENDES, 2001).

As primeiras descobertas sobre estes microorganismos se iniciaram em 1889 quando Albert Frank isolou e cultivou o primeiro rizóbio de um nódulo, denominando esta bactéria de *Rhizobium leguminosarum.*, sendo que esta, mantém o seu nome desde sua descoberta (FRED et al., 1932 citado por HUNGRIA & VARGAS, 1997). Desta forma, surgiu o gênero *Rhizobium* que englobava todos os rizóbios conhecidos até 1982. É preciso ressaltar que estudos conduzidos pelo grupo coordenado pela pesquisadora Johana Döbereiner em 1970 verificaram que as estirpes de rizóbio que nodulavam soja (*Glycine max*), na época chamadas *Rhizobium japonicum*, se separavam em dois grupos. Todas as estirpes estudadas apresentaram a mesma capacidade de fixar o N da FBN, entretanto aquelas pertencentes ao Grupo I tiveram uma massa de nódulos bem menor do que aquelas do Grupo II (DÖBEREINER et al., 1970). Estes autores denominaram as estirpes do Grupo I como de alta eficiência, baseando-se na alta relação de N fixado em relação à massa seca dos nódulos das plantas.

Mais tarde houve uma mudança proposta por JORDAN (1982), baseando-se no critério de diferença de crescimento, no qual as bactérias fixadoras de N₂ que nodulam leguminosas, foram divididas em espécies de crescimento rápido (*Rhizobium spp.*) e de crescimento lento (*Bradyrhizobium spp.*). As bactérias fixadoras que nodulam leguminosas de origem tropical, incluindo soja, são predominantemente de crescimento lento e foram então, classificadas como *Bradyrhizobium japonicum*. Posteriormente, diferenças entre os genótipos dessas bactérias levaram KUYKENDALL et al., (1992) a sugerirem uma subdivisão de *Bradyrhizobium japonicum* em duas espécies: *Bradyrhizobium japonicum* com estirpes pertencentes ao Grupo I e *Bradyrhizobium elkanii* com estirpes do Grupo II. Estas estirpes têm um metabolismo diferenciado entre si que pode influenciar na quantidade de N fixado e acúmulo de matéria seca pela leguminosa.

No trabalho desenvolvidos por NEVES et al. (1985), as estirpes investigadas seguiram o padrão apresentado acima, e foram classificadas em Grupo I, as estirpes *B. japonicum*, e as do Grupo II, como *B. elkanii*. Entretanto, das três estirpes de Grupo I estudadas por estes autores (965, CB 1809, DF 383), somente a CB 1809 (SEMIA 586, USDA 136) foi subsequentemente estudada e classificada como *B. japonicum* e das três estirpes do Grupo II (29W, DF 395 e SM1b) somente 29W (SEMIA 5019) foi classificada como *B. elkanii* (CHUEIRE et al., 2003).

RUMJANEK et al. (1993) classificou as estirpes brasileiras 29W (SEMIA 5019) e 587 (SEMIA 587) como pertencentes à espécie *Bradyrhizobium elkanii* baseado na similaridade de sequências do 16S rDNA e reatividade contra anticorpos sorogrupos de estirpes internacionais como USDA76 e USDA 31. As estirpes CPAC 7 (derivada da estirpe CB 1809) e CPAC 15 (SEMIA 566), que desde 1992 são recomendadas pelo Ministério da Agricultura para a fabricação de inoculantes comerciais, foram classificadas como *B. japonicum* baseado em aspectos fisiológicos (CHUEIRE et al., 2003).

2.2. O Efeito Estufa e a Agricultura

Existem dois tipos de efeito estufa: o natural e o antrópico. O efeito estufa é um processo essencial à vida no planeta. O processo natural ocorre devido às concentrações de gases do efeito estufa na atmosfera antes do aparecimento do homem. A energia solar de comprimento de onda muito curto ultrapassa a atmosfera terrestre sem interação com os gases presentes nesta camada. Ao atingir a superfície terrestre a energia é refletida e volta para a atmosfera com um comprimento de onda mais longo (radiação infravermelha) que interage parcialmente com os gases do efeito estufa presente nesta camada. Parte dessa irradiação é absorvida na atmosfera e conseqüentemente aumenta a temperatura do ar. Isso permite que a temperatura média da atmosfera terrestre seja de 15° C. Caso não houvesse esses gases na atmosfera, a temperatura média da Terra seria 33° C menor, ou seja -18° C, o que inviabilizaria a vida atualmente existente (BAIRD, 2002).

Contudo, o fenômeno de aquecimento global tem causado grande preocupação com relação à saúde e a segurança pública devido à vulnerabilidade da agricultura, florestas e sistemas marinhos (MCCARTHY et al., 2001). Esta preocupação se deve ao aumento da concentração dos gases de efeito estufa (GEE) presentes na atmosfera que vem ocorrendo desde a Revolução Industrial, onde se verificou o aumento do uso de combustíveis fósseis, intensa atividade industrial e mudanças no uso da terra. Esse aumento contínuo de gases na atmosfera trouxe como consequência, maior interação com a radiação infravermelha emitida pela Terra, e com isso, aumento da temperatura do ar atmosférico. O aquecimento global tem reflexos nas mudanças climáticas, tais como distribuição irregular das chuvas, aumento ou diminuição de temperaturas da atmosfera, elevação do nível do mar, entre outros.

No Brasil o padrão de emissão de gases pelas atividades humanas é completamente diferente da situação global. No nosso caso, as práticas agrícolas e as mudanças do uso da terra devido ao desmatamento são as principais fontes de emissão dos GEE. Atualmente,

aproximadamente 75% do CO₂ que o Brasil emite para a atmosfera são derivados de práticas agrícolas e do desmatamento e o restante é derivado da queima de combustíveis fósseis. Na classificação mundial dos países emissores de GEE, o Brasil está situado em 17º lugar, se não levarmos em consideração o desmatamento, e em 5º lugar se considerarmos essa atividade humana (CERRI et al., 2006).

Em geral, somente três gases do efeito estufa são emitidos pela agricultura: gás carbônico (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O), (DUXBURY et al, 1994). Cada um desses gases apresenta uma capacidade de aquecimento dependendo de suas características moleculares e de seu tempo de permanência na atmosfera, ou meia-vida na atmosfera. Com base nisso, calcula-se o potencial de aquecimento global (PAG) de cada GEE considerando o CO₂ como referência. Dessa forma, se uma molécula de gás com maior meia-vida na atmosfera possui todos os outros fatores iguais, terá o PAG mais alto que outra com ciclo menor na atmosfera. Para uma expectativa de meia-vida de 100 anos, o N₂O têm PAG de 296 equivalentes de CO₂, enquanto que para 20 anos, o PAG é de 275 equivalentes de CO₂ (ROBERTSON & GRACE, 2004).

O CO₂ tem um papel de destaque do ponto de vista do aquecimento global por ser o mais abundante na atmosfera e pelas grandes emissões advindas de atividades antrópicas (Houghton et al., 2001). Enquanto CH₄ e especialmente N₂O estão presentes em concentrações atmosféricas muito mais baixas do que CO₂, seus PAGs são altos o bastante para que pequenas alterações tenham um efeito desproporcional na atividade radiativa da atmosfera (ROBERTSON & GRACE, 2004). O N₂O aumentou sua concentração em 16%, passando de 270 ppb para 316 ppb desde a Revolução Industrial. As principais emissões desse gás ocorrem devido à atividade industrial, queima de biomassa e, em cerca de 60 a 80% pela atividade agrícola (HOUGHTON et al., 2001). Segundo MOSIER (2004), o aumento da concentração de N₂O está diretamente relacionado com a interferência do homem no ciclo do N, que por sua vez está principalmente ligado a agricultura.

2.3. Método direto de avaliação do fluxo de gases do efeito estufa

A contribuição da agricultura para o efeito estufa antrópico (ROBERTSON et al., 2000), pode ser reduzida, com o desenvolvimento de sistemas de manejo do solo que sejam capazes de diminuir as emissões de GEE (JANZEN et al., 1998; BAYER et al., 2000). Esta diminuição significa intervenção no modelo mais utilizado atualmente a fim de se reduzir as emissões ou aumentar os sumidouros de GEE (IPCC, 2001). Ainda segundo o IPCC, a

agricultura é um dos setores da atividade humana mais vulnerável aos efeitos de possíveis alterações climáticas, em função da dependência do desenvolvimento e produtividade das culturas aos fatores climáticos. A previsão do impacto da elevação da temperatura em ecossistemas naturais e na agricultura ainda é bastante discutida, mas entre algumas possíveis consequências, temos a elevação do nível dos oceanos em até 0,8m e alagamento de áreas costeiras, alternância de excessos e déficits hídricos e mudanças na aptidão agrícola de diferentes regiões do mundo (IPCC, 2001)

Como signatário do Protocolo de Quioto, para cumprir parte dos compromissos assumidos, o Brasil desenvolve inventários das emissões de GEE das atividades agropecuárias, elaborado conforme recomendações do Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima (Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC). No entanto é preciso destacar que para se ter um inventário direcionado as nossas condições, informações mais precisas fornecidas por pesquisas de abrangência nacional direcionadas à avaliação das emissões em sistemas de produção foram extremamente necessárias. Em estudos deste tipo, é fundamental a definição do método a ser utilizado nas avaliações dos GEE e atualmente vários métodos para avaliação das emissões de CO₂, CH₄ e N₂O já estão consolidados.

Para se realizar avaliações diretas das emissões GEE, como no caso deste estudo, demanda-se a utilização de câmaras de coleta do gás. A câmara dificulta a passagem do ar liberado do solo para a atmosfera, de modo que as mudanças de concentração do gás dentro da câmara possam ser medidas. Para isso, amostras de ar do interior da câmara são coletadas em intervalos de tempo previamente determinados, sendo a variação na concentração dos GEE quantificadas no local da coleta quando se utiliza sistemas automatizados, ou posteriormente, no laboratório, por infravermelho ou cromatografia gasosa. A partir da variação da concentração dos gases no tempo estabelecido, estima-se o efluxo ou influxo dos GEE no sistema solo-atmosfera (HUTCHINSON & LIVINGSTON, 1993).

As câmaras podem ser do tipo fechadas ou abertas. No sistema aberto, é mantido um fluxo contínuo de ar através da câmara, com a concentração do gás atingindo uma diferença constante em relação à concentração do ar atmosférico. Nas câmaras fechadas, não há renovação do ar, sendo contínuas as mudanças de concentração do gás (MATTHIAS et al., 1980; DENMEAD & RAUPACH, 1993). A utilização de câmaras fechadas é mais comum. Entretanto, as alterações promovidas por elas no microambiente a partir de sua instalação, devem ser consideradas para a adequada interpretação dos resultados (DENMEAD & RAUPACH, 1993; HUTCHINSON & LIVINGSTON, 1993). HUTCHINSON &

LIVINGSTON (1993) destacam ainda que as fontes potenciais de erro nas estimativas de fluxo com a utilização de câmaras fechadas são as mudanças físicas ocorridas no ambiente, das quais se destacam as variações de temperatura, pressão e concentração dos gases dentro da câmara, e modificações na estrutura do solo. Os mesmos autores destacam também, como possíveis fontes de erro, o manuseio e a análise das amostras, o emprego de modelos imprecisos ou métodos inadequados para o cálculo do fluxo, além de erros originados em amostragem feitas por diferentes pessoas.

As dimensões e o material de construção das câmaras utilizadas para coleta das amostras de ar não são padronizado, mas de modo geral, são fabricadas com materiais que não sofrem degradação no campo e apresentem menor aumento da temperatura no interior da câmara, e que causem o mínimo possível de perturbações no local de instalação.

A altura e tamanho da câmara dependem do objetivo da pesquisa: se a avaliação é em solo com ou sem plantas e características morfológicas da espécie utilizada. As amostras do ar incubado podem ser coletadas manualmente, utilizando-se seringa. É importante que o material da seringa não seja permeável ao gás a ser analisado. As seringas de nylon podem ser utilizadas para a coleta e armazenamento das amostras pois permitem o armazenamento das mesmas, sem perdas gasosas, em até uma semana após a coleta (FERNANDES et al., 2002). As seringas de polipropileno também podem ser utilizadas para a coleta e armazenamento das amostras de ar (BALL et al., 1999; CHOUDHARY et al., 2002), mas neste caso é necessário que a análise do gás seja feita em até 24 horas para se evitar perdas, já que o polipropileno é um material mais permeável (CHOUDHARY et al., 2002). A quantificação do fluxo de gases também podem ser realizadas armazenando-se as amostras de ar em frascos de vidro previamente evacuados (KHALIL et al., 2004; SITAULA et al., 1992), e mantidos fechados por uma tampa de borracha e cobertos por uma camada de silicone para evitar as perdas de amostra ou imersos em água..

2.4. Análise por cromatografia gasosa

Os principais componentes de um sistema de cromatografia são o gás carregador, a coluna cromatográfica, o detector e o sistema computacional para processamento dos dados. O planejamento de um sistema cromatográfico deve ser orientado em função do gás que se deseja quantificar, a faixa de concentração que este se apresenta na amostra e quais os outros componentes presentes dos quais se precisa separá-lo. Um sistema cromatográfico permite escolher adequadamente os componentes e montá-los em um só aparelho para quantificar os

três GEE. A quantificação por cromatografia exige a presença de um detector adequado e sensível o suficiente para o gás que se deseja analisar. O gás CO₂ pode ser quantificado em cromatógrafos equipados com detector de condutividade térmica (Thermal Conductivity Detector - TCD) (BRAITHAWAITE & SMITH, 1999; BALL et al., 1999; SITAULA et al., 1992) e de captura de elétrons (ECD – Electron Capture Detector) (RUSER et al., 1998; FERNANDES et al., 2002; FLESSA et al., 2002). O detector de TCD é considerado detector universal, mas sua sensibilidade é baixa (ppm), e, portanto não é adequado para a quantificação de N₂O e CH₄ que estão presentes na atmosfera na ordem de ppb. O óxido nitroso é usualmente quantificado por detector ECD (CHENG et al., 2004; FERNANDES et al., 2002; BAGGS et al., 2002). Portanto, quando se utiliza um detector de ECD tem-se a possibilidade de quantificar tanto o gás N₂O quanto o CO₂. Já para o CH₄ é utilizado o detector de ionização de chama (FID – Flame Induced Detector) quando se utiliza amostras de ar atmosférico (SITAULA et al., 1992; FERNANDES et al., 2002; FLESSA et al., 2002; RUSER et al., 1998). A coluna e o gás de arraste de um sistema cromatográfico devem ser eficientes para a separação dos compostos a serem quantificados. A coluna em um sistema cromatográfico tem a função de determinar retenção dos compostos na coluna de modo que cada composto alcance o detector em diferentes tempos (tempo de retenção). O gás de arraste deve ser quimicamente inerte e com baixo teor de contaminante, podendo ser utilizado hélio, nitrogênio ou hidrogênio. Em cromatografia, existe a possibilidade de montar sistemas com colunas capilares “megabore”, ou colunas empacotadas. Entre as colunas empacotadas a mais utilizada é a PORAPAK- Q (CHENG et al., 2004), que apresenta eficiência para a separação dos três gases. Um cromatógrafo pode ser equipado com três detectores (TCD, ECD e FID) ou, alternativamente, com dois detectores (ECD e FID), sendo que as duas situações possibilitam a quantificação do CO₂, CH₄ e N₂O em amostras de ar (SITAULA et al., 1992). A utilização de colunas megabore, na maioria das vezes, requer sistemas cromatográficos mais sofisticados, apresentando pré-colunas e “back-flush” (SITAULA et al., 1992).

O procedimento de coleta de gás para análise por cromatografia gasosa (CG), geralmente é realizado com a utilização da câmara fechada. São coletadas várias amostras do ar incubado em um determinado intervalo de tempo. A coleta e o armazenamento das amostras são realizados com seringas ou frascos de vidro. A CG apresenta-se como técnica já consolidada para quantificação das emissões dos três GEE, (LINN & DORAN, 1984; LOFTFIELD et al., 1997; KESSAVALOU et al., 1998; MOSIER, et al., 1998; BALL et al., 1999). Já que a avaliação dos GEE é importante, a técnica de cromatografia gasosa, por ser já

consolidada, oferece maior praticidade para seus usuários devido a maior disponibilidade do apoio técnico na manutenção dos equipamentos.

2.5. Ciclo do Nitrogênio

O nitrogênio é um dos compostos essenciais à sobrevivência e crescimento dos todos os organismos por ser um importante componente das biomoléculas. Ele compõe a estrutura de ácidos nucleicos, vitaminas, aminoácidos, proteínas, pigmentos, entre outros componentes celulares. Na natureza estão presentes diversos compostos que contém nitrogênio, devido à existência de um grande número de estados de oxidação que ele pode assumir (MAHAN & MYERS, 1993). As diferentes formas do nitrogênio circulam no meio ambiente através do ciclo do nitrogênio. Este ciclo é realizado por uma complexa combinação entre muitos microorganismos que catalisam diferentes reações. Importantes etapas do ciclo só ocorrem graças à esses microorganismos (ETCHEBEHERE, 2005).

As transformações dos compostos nitrogenados resultantes do metabolismo microbiano nos processos de fixação, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia do amônio via nitrito e redução dissimilatória do nitrato, estão representadas no ciclo do nitrogênio abaixo, (YE & THOMAS, 2001):

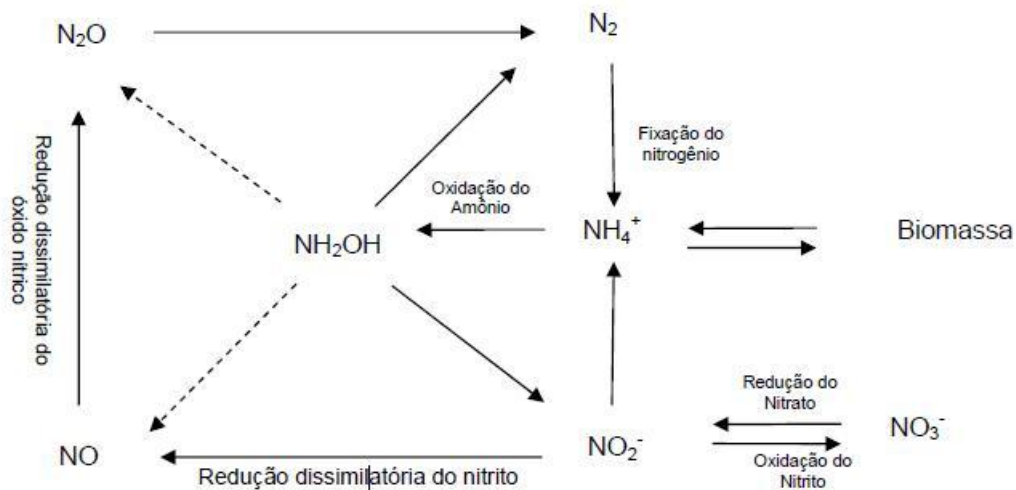
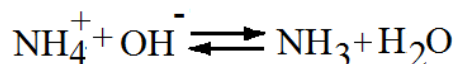


Figura 1. Ciclo do Nitrogênio (Adaptado de YE & THOMAS, 2001).

O nitrogênio elementar (N_2) é uma substância inerte, sendo introduzido na cadeia alimentar através da fixação. Esta fixação pode ocorrer pela ação de descargas elétricas (relâmpagos), fixação industrial (indústria de fertilizantes), embora a maior parte de toda a fixação seja realizada por bactérias fixadoras de nitrogênio. Estas bactérias são capazes de transformar o nitrogênio elementar em nitrogênio amoniacal e este está presente no meio

ambiente de forma equilibrada em relação ao íon amônio.



Este íon (NH_4^+) pode ser assimilado por síntese celular ou oxidado a nitrato e nitrito pela atividade das bactérias nitrificantes, através do processo de nitrificação. Uma das etapas posteriores compreende a conversão dos compostos oxidados de nitrogênio a nitrogênio molecular, que é devolvido à atmosfera através do processo de desnitrificação.

A desnitrificação é responsável pela remoção do nitrogênio das formas oxidadas de nitrato ou nitrito, e conversão a nitrogênio gasoso, através da oxidação de uma fonte de carbono. Esta fonte funciona como um doador de elétrons, enquanto nitrato e nitrito agem como receptor de elétrons na cadeia respiratória. Biologicamente a desnitrificação ocorre em condições anóxicas, ou seja, ausência de oxigênio dissolvido na forma molecular, associada à presença de nitratos (FERREIRA, 2000; MENDONÇA, 2002; ISOLDI & KOETZ, 2004). As bactérias mais conhecidas para a realização da desnitrificação são as *Pseudomonas*, embora sejam conhecidas muitas bactérias heterotróficas, anaeróbias ou facultativas, capazes de realizar o processo em condições anóxicas, como *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Spirillum* e *Rhizobium* (ISOLDI & KOETZ, 2004). Na primeira etapa da redução do nitrato (NO_3^-) por estas bactérias, ocorre a conversão do nitrato a nitrito (NO_2^-) catalisada pela enzima nitrato redutase, codificada pelo gene *NapA*. A produção de óxido nítrico (NO) é considerada a etapa que define a desnitrificação (ZUMFT, 1997; SHAPLEIGH, 2007) e é codificada pelo gene *NirK*. A redução de óxido nítrico a óxido nitroso (N_2O) é realizada pela enzima óxido nítrico redutase e é codificada pelo gene *NorC*.

A capacidade de reduzir NO a N_2O não é exclusiva da desnitrificação, como NO é altamente tóxico e um composto de sinalização intracelular poderoso, os microorganismos podem utilizar este processo também como um meio de desintoxicação (ZUMFT, 2005). Finalmente, a conversão de N_2O para N_2 é realizado pela enzima óxido nitroso redutase que é codificada pelo gene *NosZ*, fechando assim o ciclo do nitrogênio que pode então voltar a biosfera através da fixação do nitrogênio. A **figura 2 e 3** abaixo mostram as sequências de reações envolvidas, as enzimas e os genes essenciais ao processo.

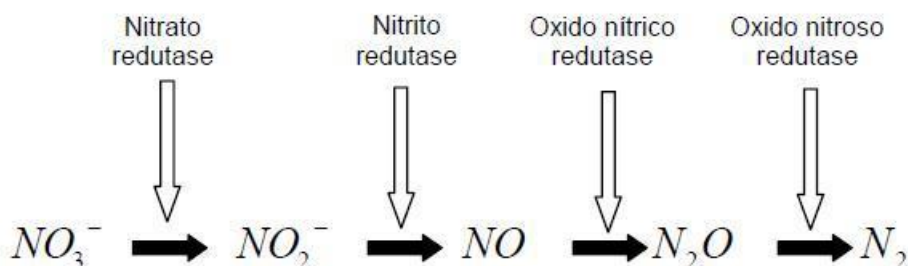


Figura 2. Rota metabólica e enzimas envolvidas no processo de desnitificação.

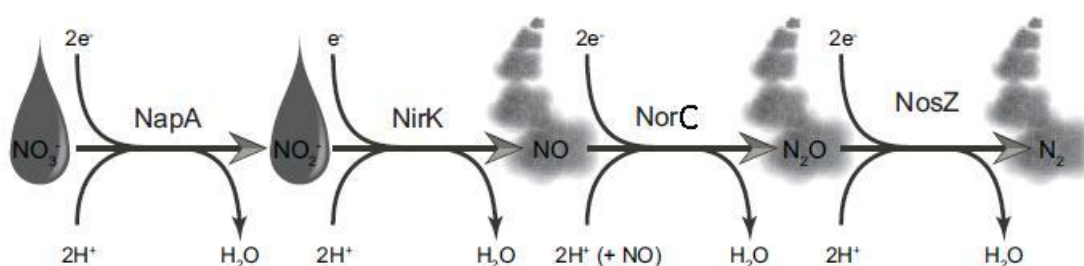


Figura 3. Via de desnitificação, com produtos solúveis e gasosos indicados, e os genes responsáveis por cada etapa do processo (Adaptado de ZUMFT, 2005).

2.6. Emissão de N₂O e Fixação Biológica de Nitrogênio

Pesquisas sobre a relação direta das emissões de N₂O com o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) surgiram a partir dos anos 80 com BREMNER et al. (1980) e mais tarde com DUXBURY et al. (1994). Estes estudos foram reforçados com a demonstração da capacidade desnitrificadora do rizóbio por O'HARA & DANIEL em 1985. Várias espécies de *Rhizobium*, na forma de vida - livre, em nódulos de raiz de leguminosas ou como bacteróides isolados podem desnitificar o nitrato (NO₃⁻) e liberar N₂O (GARCIA-PLAZAOLA et al., 1993). A desnitificação pode trazer vários benefícios para o rizóbio, como a eliminação do nitrato, que é deletério à atividade da nitrogenase em nódulos (LUCINSKI et al. 2002) e também retirar o nitrito (NO₂⁻) tóxico e fornecer a energia durante a respiração de nitrato (ROCHETTE & JANZEN, 2005). Apesar destas conclusões e de estimativas de que a FBN poderia contribuir com até 22% das emissões de N₂O da agricultura no Canadá (DESJARDINS & RIZNEK, 2000), os dados empíricos diretos são poucos na produção de N₂O associado à FBN.

Em 1996 o IPCC propôs um fator de emissão direta para a FBN semelhante ao de

adubos nitrogenados devido aos poucos resultados para precisar o efeito das emissões de óxido nitroso (N_2O) por esta fonte. Este valor, portanto, poderia estar distante de um valor real para esta situação, uma vez que a emissão de N_2O é dependente da disponibilidade de nitrogênio e nem todo o N fixado estará disponível no solo. Segundo a metodologia utilizada pelo IPCC, a produção de N_2O pode ocorrer durante a própria FBN, ou pode ser produzido quando os resíduos de leguminosas são devolvidos ao solo. Nesta segunda forma, quando os resíduos ricos em nitrogênio (baixa relação C: N) se decompõem no solo, eles podem liberar grandes quantidades de N mineral ficando suscetível à perda de N_2O em função da nitrificação e desnitrificação (ROCHETTE & JANZEN, 2005).

Alguns autores já demonstraram que cerca de 94% da emissão total de N_2O atribuída ao ciclo completo da soja parecem ocorrer durante a formação de grãos e maturação, que compõem somente 11% do ciclo de vida da planta (YANG & CAI, 2005), embora CIAMPITI et al. (2007), tenham relatado valores próximos a 68% para um período correspondente. Isto indica que somente durante a fase final do ciclo dessa cultura a emissão de N_2O do solo seria significativa, devido principalmente, ao fato de as raízes cessarem seu crescimento, absorção de nutrientes e água do solo e também, pela própria decomposição de raízes e nódulos senescentes, assim o nitrogênio presente nesses materiais se tornaria disponível ao solo resultando na produção desse gás.

A desnitrificação foi originalmente descrita como a perda de nitrogênio fixado da biosfera para a atmosfera como parte do ciclo de nitrogênio global. No entanto, considerando a fisiologia de bactérias, desnitrificação corresponde à respiração anaeróbia de óxidos de nitrogênio que são utilizados como aceptores terminais de elétrons no lugar do oxigênio dos sistemas aeróbicos (TIEDJE, 1994). Como dito anteriormente os organismos desnitrificantes são amplamente distribuídos entre os procariotos, e cada um têm uma combinação de enzimas (nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase, e óxido nitroso redutase), que reduzem óxidos de nitrogênio específicos, respectivamente. Caso os quatro genes relacionados com a redução enzimática dos óxidos de nitrogênio (*napA*, *nirK*, *norC*, *nosZ*) sejam ativados, o gás dinitrogênio (N_2) é então, liberado na atmosfera (**Figura 1**). Devido à ausência de atividade da N_2O redutase, alguns organismos desnitrificantes são incompletos e produzem N_2O , o que colabora com o aumento do efeito estufa e causa danos à camada de ozônio. As combinações de genes desnitrificantes diferem entre os organismos (**Figura 2**).

Alguns estudos utilizando como padrão a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum*, USDA 110, mostraram que em vida livre esta bactéria produz o gás N_2 , e posteriormente uma

busca no genoma desta bactéria mostrou que ela possui os genes *NapA*, *NirK*, *NorC* e *NosZ*, comprovando sua capacidade de realizar todas as reações de redução necessárias para a desnitrificação (VELASCO et al., 2001; MESA et al., 2002; DELGADO et al., 2003; VELASCO et al., 2004). No entanto, o gênero *Bradyrhizobium sp.* é extremamente diverso e o produto final da desnitrificação (NO_2 , N_2O , N_2) depende essencialmente da estirpe estudada, como mostrado por (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006).

2.7. Utilização da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase)

A PCR (do inglês, polymerase chain reaction) é uma técnica de amplificação de DNA extremamente sensível que pode amplificar uma única molécula de DNA numa amostra complexa. Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado através de sucessivos ciclos.

Os princípios da técnica de PCR foram conceitualmente descritos em 1971 (KLEPPE et al., 1971), mas os primeiros dados experimentais só foram publicados em meados dos anos 80 (SAIKI et al., 1985). No início, a abordagem existente era lenta, cara e imprecisa. A técnica empregava banhos com temperaturas ajustadas e a enzima utilizada na reação era o fragmento obtido a partir da clivagem da DNA polimerase I de *E. coli* (o fragmento de Klenow), que não apresenta atividade exonucleásica. O uso deste fragmento (enzima termosensível) apresentava inúmeras limitações e exigia que a cada ciclo de desnaturação da dupla fita do DNA alvo, mais uma alíquota de enzima fosse adicionada (GELFAND, 1989; SAMBROOK et al., 1989). Este procedimento exigia um trabalho árduo e aumentava consideravelmente a possibilidade de contaminação. Além disso, a técnica apresentava uma desvantagem devido à termosensibilidade da enzima, que propiciava o surgimento de bandas inespecíficas (MULLIS & FALOONA, 1987). Em 1988, SAIKI e colaboradores descreveram o uso da DNA polimerase extraída da bactéria termófila *Thermus Aquaticus* na PCR. Por ser termoestável, o procedimento foi simplificado de forma extrema e, permitiu que a reação fosse processada em temperaturas mais altas, já que a temperatura ótima de reação da enzima passou de 37°C para 72°C, elevando a estringência da reação. Isso melhorou significativamente a especificidade, e aumentou a síntese de produto amplificado. A utilização da enzima termoestável permitiu a automação no processo, pois excluía a necessidade de se acrescentar enzima ao final de cada ciclo de reação diminuindo também a possibilidade de contaminação por ácido nucléico exógeno ou amplificado de outra amostra. Com o uso da Taq DNA polimerase e de outras DNA polimerases termoestáveis passou-se a utilizar

termocicladores automáticos programáveis ao invés de banhos, além disso, possibilitaram que produtos inespecíficos fossem obtidos em menor quantidade ampliando significativamente a capacidade de aplicação da PCR (ERLICH, 1991; INNIS & GELFAND, 1990).

Durante a PCR a fita dupla do DNA alvo é desnaturada a partir da elevação da temperatura para 92/95°C, que irá romper as pontes de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Esta etapa expõe a fita de DNA, denominada “template” ou molde, permitindo o anelamento dos iniciadores (*primers*). Na etapa seguinte, anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35/60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência dos iniciadores utilizados. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão (TAYLOR, 1993). Este ciclo é repetido por várias vezes e à medida que os ciclos vão se repetindo, os iniciadores são consumidos e o número de novas fitas de DNA aumenta (EISENSTEIN, 1990). Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo aumenta exponencialmente a cada ciclo, esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar a reação com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar com grandes quantidades de DNA especificamente amplificado (TAYLOR, 1993).

Dentro deste processo existe um fator importante a ser observado, que é o ajuste cuidadoso das condições ideais de concentração dos componentes da reação, já que não existe um protocolo padrão que possa ser usado sem ajuste para todas as amplificações. O número de ciclos, a concentração de MgCl₂, de enzima, de DNA molde, a temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores, devem ser cuidadosamente ajustados para cada tipo de reação que se proceda. Outro fator fundamental no preparo das reações é relacionado à fonte da qual o DNA foi ou será extraído. Além disso, a sequência e o comprimento dos iniciadores devem ser observados para uma amplificação bem sucedida. Uma alta concentração de iniciadores aumenta a probabilidade de anelamentos inespecíficos, gerando produtos não específicos e dímeros, mas em contrapartida a falta deste componente interfere na amplificação. Desta forma, a concentração dos iniciadores deve estar usualmente em torno de 0,1-1,0 pmol/μl de reação (SCHEINERT et al.,2005). A especificidade da amplificação depende principalmente das condições empregadas na etapa de anelamento, como esta etapa envolve hibridação de oligonucleotídeos, a otimização desta temperatura representa um fator essencial para o sucesso do processo. Baixas temperaturas de anelamento aumentam a probabilidade de ocorrência de produtos inespecíficos, resultando na amplificação de diferentes regiões do DNA. Por outro lado, embora temperaturas muito altas propiciem um grande aumento na

especificidade, ocorre um sensível decréscimo do rendimento (RYCHLIK et al., 1990).

Todos estes fatores são extremamente importantes, pois a introdução da PCR, em diagnósticos microbianos, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY et al., 2003) e tem permitido se observar, por exemplo, a presença ou ausência de um gene em determinada amostra ou diferenciar um grupo de organismos de outro de forma muito mais rápida do que com métodos fenotípicos tradicionais.

O uso de técnicas moleculares, como a PCR, tem estimulado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, inclusive para avaliações em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe (SCHNEIDER & DE BRUIJN, 1996) e vem sendo bastante utilizado em estudos filogenéticos (EARDLY et al., 1992; UEDA et al., 1995) para detecção e caracterização de estirpes de rizóbio (HARRISON et al., 1992; LAGUERRE et al., 1994; WATSON et al., 1995).

Baseando-se nestes fatos, o objetivo desse trabalho foi quantificar as emissões de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium* sp., recomendadas para a cultura da soja, crescidas em meio de cultura (*in vitro*) e em associação com plantas de soja em vasos, e observar a presença ou ausência dos genes ligados a desnitrificação nestas mesmas bactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo do potencial de desnitrificação de *Bradyrhizobium*, *in vitro*

O estudo foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Embrapa Agrobiologia – Seropédica RJ), durante o mês de abril de 2011. Foram testadas 12 diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* sp., recomendadas para a cultura da soja, quanto a capacidade de produzir N₂O em meio de cultura puro.

Foram selecionadas 4 estirpes de *B. japonicum* e 4 estirpes de *B. elkanii* isoladas de solos do Brasil, além de 4 estirpes de *B. elkanii* de origem asiática, pertencentes à coleção do Departamento Americano de Agricultura (USDA) (**Tabela 1**). Um tratamento controle foi adicionado ao experimento, que continha apenas meio de cultura sem bactérias, totalizando 13 tratamentos. Foi adotado um arranjo experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada um dos tratamentos foi avaliado na condição com e sem acetileno.

As bactérias foram fornecidas pelo laboratório de Coleção de Culturas da Embrapa

Agrobiologia, já crescidas e com colônias isoladas em meio 79 sólido (Fred & Waksman, 1928). A produção do inoculante foi feita a partir dessas colônias, transferidas para um erlenmeyer preenchido com 50 ml de meio 79 líquido (FRED & WAKSMAN, 1928), previamente esterilizado. As bactérias permaneceram em crescimento sob agitação por 6 dias. Após este período, uma alíquota de 3 ml desse meio com bactérias foi transferida para frascos de cromatografia de 20 ml, já esterilizados, e 1 ml foi utilizado para contagens de unidades formadoras de colônias (UFCs), conforme RELARE, 2007. Após a adição do meio contendo as bactérias, cada frasco recebeu 0,5 mL de uma solução 40 mM de NH_4NO_3 (nitrato de amônio). Os frascos foram lacrados e a atmosfera de cada um foi substituída por N_2 , a fim de se criar um ambiente limitado em oxigênio. Os tratamentos com acetileno receberam 1 ml do gás, adicionado através de uma seringa.

Após um período médio de 6 horas de incubação, a concentração de N_2O das amostras de gás foram medidas em cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Autosystem), equipado com coluna empacotada com “Porapak Q” e detector de captura de elétrons. Os dados foram ajustados às unidades formadoras de colônia (UFCs) de cada estirpe avaliada e ao intervalo de tempo entre o início da incubação e a leitura.

Os fluxos de N_2O foram calculados pela equação $\text{FN}_2\text{O} = dC/dt (V) M/V_m$, onde dC/dt é a mudança de concentração de N_2O no frasco no intervalo de incubação; V é o volume do frasco utilizado; M é o peso molecular de N_2O e V_m é o volume molecular na temperatura de amostragem. Os fluxos foram expressos em $\mu\text{g N}_2\text{O L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Tabela 1. Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* avaliadas no experimento.

| Estirpe | Outras nomenclaturas | Origem |
|---------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>B. japonicum</i> | | |
| SEMIA 5080 | BR 85, CPAC 7 | Brasileira |
| SEMIA 5079 | BR 86, CPAC 15 | Brasileira |
| USDA 06* | BR 114 | USA (originalmente Ásia) |
| USDA 110 | BR 116 | USA (originalmente Ásia) |
| <i>B. elkanii</i> | | |
| SEMIA 5019 | BR 29, 29 W | Brasileira |
| SEMIA 587 | BR 96 | Brasileira |
| DF 395 | BR 76 | Brasileira |
| SM1b | BR 1 | Brasileira |
| USDA 76* | BR 115 | USA (originalmente Ásia) |
| USDA 46 | BR 120 | USA (originalmente Ásia) |
| USDA 94 | BR 121 | USA (originalmente Ásia) |
| USDA 130 | BR 123 | USA (originalmente Ásia) |

*= estirpes padrão “type strains”

3.2. Amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA para diferenciar duas espécies de *Bradyrhizobium*.

3.2.1. Extração de DNA genômico

As bactérias utilizadas no experimento *in vitro* foram crescidas, separadamente, em 50 ml de meio líquido YM (FRED & WAKSMAN, 1928), durante três dias a 30° e 120 rpm. Em seguida, 1 ml de cultura bacteriana foi transferido para um microtubo (eppendorf) de 1,5 ml, e foram centrifugadas, por 5 min. a 7500 rpm e o sobrenadante foi eliminado. Logo após, procedeu-se a extração do DNA genômico de cultura bacteriana utilizando o Kit QIAamp DNA mini (QIAGEN cat. N° 51304) seguindo as orientações do fabricante.

O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, e posteriormente foi utilizado para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para se confirmar a identificação das 12 diferentes de estirpes de origem brasileira e asiática pertencentes às duas espécies de *Bradyrhizobium*, foi utilizada a técnica de PCR e iniciadores (“primers”) específicos para *B. japonicum* e *B. elkanii*.

Para amplificação da região do DNA que codifica o gene 16S rDNA foram utilizados três oligonucleotídeos iniciadores combinados dois a dois, sendo um comum para o gênero e um específico para cada espécie de *Bradyrhizobium*. As sequências dos iniciadores utilizados foram definidas por GIONGO, et al., 2007 e são apresentados Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* quanto à espécie.

| Abreviação | Anotação | Sequência dos iniciadores |
|------------|---|---------------------------------|
| Brady | Iniciador para o gênero <i>Bradyrhizobium</i> | 5'-AMTKCCTTTGAKWYTKAAGATCTTG-3' |
| BElk | Iniciador para espécie <i>B. Elkanii</i> | 5'-AACTCCGTCTCTGGAGTCCGCGA-3' |
| BJap | Iniciador para espécie <i>B. Japonicum</i> | 5'-GTCACATCTCTGCGACCGGTC-3' |

3.2.2. Condições das reações de PCR

Foram utilizados 2 µl de DNA genômico previamente extraídos para a reação de amplificação em termocicladores (Mastercycler 08E008 Gradient Eppendorf), acrescido de 1 µl de cada iniciador (Brady + BElk ou Bray + BJap, 10 mM), 0,5 µl de dNTP (10mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 2,5 µl de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl), 0,2 µl da enzima Taq DNA polymerase 5 U/µl (Invitrogen, Cat. No. (S7563), 3µl de DMSO 50%, completando o volume de 25 µl com H₂O livre de nucleases.

No termociclador a reação foi incubada por 1 minuto a 94°C, e prosseguiu por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e novamente incubada por 5 minutos a 72°C.

3.2.3. Análise por eletroforese em gel de agarose

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose. Para tal, o gel foi preparado com a mistura de 100 ml de tampão (TAE - Tris-acetato-EDTA) e 1g de agarose. Essa solução foi aquecida em microondas até ficar homogênea e transparente, e depois transferida para uma cuba de eletroforese horizontal. Sobre a solução ainda morna colocou-se um pente (uma tira de teflon denteada que ficará 1 mm acima do fundo da forma)

que serviu como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Essas minúsculas cavidades serviram como reservatórios onde as amostras de DNA foram aplicadas. Ao esfriar e polimerizar, a agarose fica com o aspecto gelatinoso e com resistência diretamente proporcional à concentração de agarose utilizada (1%).

Antes de serem aplicadas ao gel, as amostras foram preparadas misturando-se 5 µl do produto da PCR com 2 µl de tampão da amostra e 3 µl de água livre de nucleases. As amostras foram aplicadas ao gel para confirmação da amplificação e verificação dos tamanhos dos fragmentos através da comparação com o padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Cat. No. 10787-018). A eletroforese ocorreu por 1 hora a 90 V, em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em foto documentador Kodak Logic 100 (Kodak).

3.3. Avaliação da presença de genes relacionados com a desnitrificação

As bactérias utilizadas no experimento *in vitro* tiveram o DNA extraído conforme descrito anteriormente.

Para se avaliar a presença dos genes ligados a desnitrificação (*napA*, *nirK*, *norC*, e *nosZ*), iniciadores específicos para cada um dos genes desenhados foram utilizados nas reações de PCR (**Tabela 3**). Além disso, iniciadores anteriormente utilizados por outros autores também foram usados neste estudo (**Tabela 4**). Para o desenho dos iniciadores a sequência de cada gene foi utilizada para fazer uma busca no genoma da estirpe USDA 110 (*Bradyrhizobium Japonicum*), utilizando a base de dados *Rhizobase*.

A sequência de cada gene selecionado nesse banco de dados foi utilizada para desenhar os iniciadores utilizando o programa “on line” *Primer Plus 3* (UNTERGASSER et al., 2007) de forma a obter um fragmento amplificado entre 100 a 150 pares de bases.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para avaliação da presença de genes ligados a desnitrificação em estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*.

| Abreviação do gene F(direto) e R (reverso) | Anotação no genoma de <i>B. japonicum</i> (USDA 110) | Sequência dos Iniciadores (5'→ 3') – F (direto) e R (reverso) |
|---|--|---|
| BJNapAF | Subunidade precursora periplasmática da nitrato redutase | GGCCTGATCAACGCCTACTG |
| BJNapAR | Subunidade precursora periplasmática da nitrato redutase | ATAGGCATCCGAGACCACGA |
| BJNirKF | Respiratório nitrato redutase | GGTCGTCATCGACGAGAAGG |
| BJNirKR | Respiratório nitrato redutase | GGATTGACCAGCGTCGTTTC |
| BJNorCF | Subunidade C da Oxido Nítrico redutase | TGCATCAACTGCCACACCTT |
| BJNorCR | Subunidade C da Oxido Nítrico redutase | GACTGCATCCAGGCCTTCAG |
| BJNosZF | Óxido nitroso redutase | TTGTTCCCTCGACAGCCAGGT |
| BJNosZR | Óxido nitroso redutase | CTCCTTGGTCTGACCCATCG |
| BJ16SF | 16S rDNA | CAAGCGGTGGAGCATGTG |
| BJ16SR | 16S rDNA | GGACATGTCAAGGGCTGGTAA |

Tabela 4. Referências para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

| Abreviação do gene | Sequência dos Iniciadores F (direto) /R (reverso) | Referência |
|--------------------|---|---|
| <i>BJNapA</i> | GGCCTGATCAACGCCTACTG ATAGGCATCCGAGACCACGA | Sameshima-Saito et al.,2006; Harrow et al.,2007 |
| <i>BJNirK</i> | GGTCGTCATCGACGAGAAGG GGATTGACCAGCGTCGTTTC | Sameshima-Saito et al.,2006; Harrow et al.,2007 |
| <i>BJNorC</i> | TGCATCAACTGCCACACCTT GACTGCATCCAGGCCTTCAG | Sameshima-Saito et al.,2006; Harrow et al.,2007 |
| <i>BJNosZ</i> | TTGTTCCCTCGACAGCCAGGT CTCCTTGGTCTGACCCATCG | Sameshima-Saito et al.,2006; Harrow et al.,2007 |
| <i>BJ16S</i> | CAAGCGGTGGAGCATGTG GGACATGTCAAGGGCTGGTAA | Bortolan et al., 2009 |

3.3.1. Condições das reações de PCR e eletroforese em gel de agarose

Foram utilizados 1 µl dos fragmentos de DNA previamente extraídos para a reação de amplificação em termocicladores (Mastercycler 08E008 Gradient Eppendorf), acrescido de 1 µl de cada iniciador (F+R, 10 mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 2,5 µl de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl, 0,2 µl da enzima Taq DNA polymerase 5 U/µl (Invitrogen, Cat. No. S7563), completando o volume de 25 µl com H₂O livre de nucleases.

No termociclador a reação foi incubada por 1 minuto a 94°C, e prosseguiu por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e novamente incubada por 5 minutos a 72°C. O produto de amplificação foi avaliado conforme descrito anteriormente

3.4. Estudo em campo

3.4.1. Material vegetal e condições de cultivo

Um segundo estudo foi realizado em vasos ao ar livre, cujo objetivo foi avaliar a produção de N₂O ao longo do período de desenvolvimento da cultura da soja inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*.

Trinta vasos plásticos foram preenchidos com 12 kg de solo coletado na profundidade de 0-20 cm em um local nunca antes plantado com soja, na área experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço). As características químicas do solo foram analisadas no laboratório de fertilidade do solo da PESAGRO-RJ, localizado também no município de Seropédica, segundo os procedimentos do Manual de Análises Químicas dos Solos, Plantas e Fertilizantes (SILVA, 1999) e do Manual de Métodos de Análises de Solos (EMBRAPA/CNPS, 1997) e, é classificado como ARGISSOLO Vermelho Amarelo Distrófico. Os resultados de análise químicas do solo se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 . Resultado da análise química do solo antes da implantação do experimento.

| Profundidade | pH _{H₂O} | Al | Ca | Mg | P | K |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|-----|-----|---------------------|----|
| | | -----cmolc/dm ³ ----- | | | mg.dm ⁻³ | |
| 0-10 | 5,0 | 0,3 | 0,9 | 0,5 | 3,2 | 25 |

O solo coletado foi seco ao ar e passado em peneira (<3 mm) para facilitar a homogeneização. A correção do solo foi feita duas semanas antes do plantio, com aplicação de CaCO₃ na dose de 500 mg/kg de terra⁻¹, adubados com 229 mg P₂O₅ kg terra⁻¹, 80 mg K₂O kg terra⁻¹ e 50 mg de micronutrientes por kg terra⁻¹ (FTE - BR12). A mistura do solo com todos os adubos e corretivos foi realizada individualmente com o auxílio de sacos plásticos.

No plantio foram semeadas cinco sementes por vaso, previamente esterilizadas em álcool etílico (92.8° I.N.P.M.) por 30 segundos e depois em peróxido de hidrogênio por 1 min., seguidos de 10 lavagens com água estéril. O desbaste foi realizado quinze dias após a emergência, deixando-se apenas duas plantas por vaso, sendo os tratos culturais realizados de acordo com o indicado para a cultura da soja.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com 5 repetições. No estudo, quatro de seis tratamentos corresponderam à inoculação da soja, cultivar Celeste, com as estirpes BR 85 (*B. japonicum*), BR 86 (*B. japonicum*), BR 29 (*B. elkanii*) e BR 96 (*B. elkanii*), além de um tratamento sem inoculação, e um tratamento sem inoculação e sem plantio de soja. Os inoculantes foram preparados em turfa. Nos tratamentos sem inoculação aplicou-se o inoculante esterilizado.

3.4.2. Amostragem e análise de gases

Para o monitoramento dos fluxos de N₂O utilizou-se uma câmara estática fechada, composta pelo próprio vaso onde se realizou o experimento. Uma borracha foi encaixada e

colada sobre a borda do vaso que continha o solo, para que este funcionasse como a base da câmara estática. A parte móvel da câmara foi outro vaso igual ao da base, vazio, com a borda também recoberta com uma borracha isolante, sendo que esta era pressionada contra a parte fixa com o auxílio de presilhas e elásticos de borracha (**Figura 4**).



Figura 4. Esquema da câmara utilizada para coleta do gás.

A câmara continha uma válvula de três vias para permitir a amostragem do ar interno da câmara quando posicionada sobre a base, nos momentos de avaliação da produção de N_2O . As amostras eram retiradas com seringas (**Figura 4**) e transferidas para frascos de cromatografia lacrados com septos de borracha butírica.

Com a utilização de uma bomba de vácuo, garantia-se que todos os frascos eram evacuados no momento da amostragem com uma pressão negativa de 80 kPa. Era realizada uma amostragem num tempo inicial, sempre entre 8 e 9 horas da manhã, chamado de tempo zero, e num período de 30 minutos após o fechamento das câmaras, fazia-se a amostragem de ar de cada uma, reabrindo as câmaras em seguida.

As avaliações de N_2O foram feitas um dia antes e durante 63 dias após o plantio de sementes de soja com os tratamentos com e sem inoculação. O solo foi mantido úmido, acima da capacidade de campo, mas não totalmente saturado, de forma a dar condições muito favoráveis para ocorrência de desnitrificação, e boa germinação das sementes.

As análises das concentrações de N_2O foram realizadas no Laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia, utilizando um cromatógrafo de gás (Shimadzu, modelo GC -2014AF)

equipado com uma coluna de "Porapak Q" e um detector de captura de elétrons. Antes de cada conjunto de análises, eram injetados padrões para o cálculo das concentrações de N₂O de cada amostra. Os padrões utilizados foram 480 nmol/mol, 800 nmol/mol, 1200 nmol/mol e 10000 nmol/mol de N₂O.

Os fluxos de N₂O consistem na diferença entre as concentrações de cada amostra dos tratamentos e a concentração das amostras no tempo zero, sendo calculados pela equação $FN_2O = dC/dt (V/A) M/V_m$, onde dC/dt é a mudança de concentração de N₂O na câmara no intervalo de incubação; V e A são respectivamente o volume e a circunferência do vaso utilizado como câmara; M é o peso molecular de N₂O e V_m é o volume molecular na temperatura de amostragem. Os fluxos foram expressos em $\mu\text{g N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$. Após o cálculo dos fluxos, foram estimadas as emissões para o intervalo de tempo estudado. Inicialmente, este cálculo foi feito multiplicando-se os fluxos obtidos em $\mu\text{g N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ por 24, para se obter o fluxo total diário. Para o cálculo dos fluxos nos intervalos de dias em que não foram feitas medições, multiplicou-se o número de dias do intervalo pela média das emissões dos dias onde houve amostragem que definiam este intervalo. A emissão total no período foi a soma das emissões estimadas para cada dia.

3.4.3. Amostragem e análise de tecido vegetal

As plantas de soja foram coletadas aos 90 dias após o plantio, quando se avaliou a massa seca da parte aérea e raízes, através da secagem deste material em estufa a 65 °C. Após esse procedimento, as amostras foram pesadas e processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm) e, posteriormente moídas em moinho de rolo (SMITH & MYUNG, 1990). Para a determinação de N total em parte aérea, utilizou-se 200 mg do material previamente moído e para raiz utilizou-se 300 mg. Para esta análise, foi realizada a digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994).

3.4.4. Análise de consumo de N₂O pelos nódulos

Após a coleta da parte aérea, as raízes foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de solo e assim facilitar a retirada dos nódulos. Estes foram coletados manualmente, evitando-se que ficassem mais do que duas horas expostos antes das análises.

Os nódulos foram pesados e logo depois esterilizados em álcool etílico (92.8° I.N.P.M.) por 1 minuto e, em peróxido de hidrogênio por 30 segundos, seguidos de 10 lavagens com água estéril e por fim, ficaram secando durante 5 minutos em temperatura

ambiente.

Após este procedimento, foram pesados separadamente 0,3g de nódulos para cada tratamento e cada um destes tratamentos foram colocados em três frascos de cromatografia (20 ml). Os frascos foram lacrados e com o auxílio de uma bomba de vácuo manual foram evacuados a -80 kPa permitindo que fossem acrescentados 25 ml de padrão 1200 ppb N₂O. As leituras foram realizadas conforme mencionado anteriormente.

3.5. Análise de nitrito, nitrato e emissão de N₂O pelos nódulos incubados em solução de nitrato.

3.5.1. Preparo das amostras e análises

Após a coleta e esterilização dos nódulos, conforme mencionado anteriormente, 0,3g do material foi pesado e colocado em frascos de cromatografia, sendo que para cada tratamento do experimento de campo este procedimento foi feito em triplicata.

Logo após, 1ml da solução de 10 ppm de nitrato foi acrescentada aos frascos. Estes foram lacrados e a atmosfera de cada um foi substituída por N₂, a fim de se criar um ambiente limitado em oxigênio. Após 4 horas em repouso, as amostras de gás dos frascos foram levadas ao cromatógrafo de gases e o fluxo de N₂O foi avaliado. Para os cálculos, as variáveis foram ajustadas pelo intervalo de tempo entre a análise do primeiro frasco e de cada um dos outros, já que a última leitura tinha uma diferença de cerca de 5 horas da primeira.

Assim que as leituras de N₂O terminaram, todos os frascos foram abertos e 0,5 ml da solução foi transferida para um tubo de ensaio onde se acrescentou 3 ml de água. Em seguida, a absorbância das amostras foi medida para nitrato conforme realizado com as amostras padrões. Ao final das leituras, todas as amostras receberam 1 ml da solução de Griss e após 15 minutos a absorbância em 532 nm foi medida.

3.5.2. Preparo das soluções

A solução padrão de íons nitrito 1000 ppm foi preparada dissolvendo-se 492,85 mg de nitrito de sódio (NaNO₂) em um balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com água destilada. Esta solução serviu de padrão e estoque para todas as diluições feitas durante todo o experimento (NORMAN et al., 1985).

O método oficial para determinação do nitrito envolve, geralmente, os procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griss. Para isso, 1g de sulfanilamida, 0,05g de cloridrato de N-(1 naftil) etilenodiamina (NED) e 5 ml de ácido fosfórico foram dissolvidos

em um balão volumétrico de 50 ml completo com água destilada. O balão com a solução foi envolvida com papel laminado e mantida em geladeira, garantindo que permanecesse no escuro até o momento das análises. Nessa reação o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido e o composto formado reage com o cloridrato de N-(1 naftil) etilenodiamina (NED), gerando uma coloração rosa intensa.

Para a solução padrão de 1000 ppm de N na forma de nitrato, 721,42 mg de nitrato de potássio (KNO_3) foram dissolvidos em um balão volumétrico de 100 ml e acrescido de água destilada até completar o volume.

Posteriormente foi feita uma solução de uso a 10 ppm de N-NO_3 , adicionando-se 1ml de cada uma das soluções padrão e acrescentando-se água destilada até o volume de 100ml. Logo após, uma curva analítica foi obtida diluindo-se 3; 5; 7; 10; 13; e 15 mL dessa solução em seis balões volumétricos para 100ml, resultando nas seguintes concentrações 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,3 e 1,5 ppm (mg L^{-1}), respectivamente. Após 15 minutos, a absorvância foi medida em 220 e 275nm para nitrato e em 532nm para nitrito, tanto para o branco (água) quanto para os padrões da curva analítica (NORMAN et al., 1985).

3.5.3. Análises estatísticas

Os gráficos que demonstram a variação dos fluxos de N_2O pelo tempo foram feitos utilizando a média de cada amostragem e respectivo erro padrão. Nos dados de emissões acumuladas de N_2O , foram realizadas a análise de variância (ANOVA) com a aplicação do teste F e, para as variáveis cujo teste F foi significativo, compararam-se as médias de tratamentos pelo teste t (LSD), ($p=0,05$). Em algumas variáveis, foi encontrada ausência de normalidade dos erros, sendo os dados de emissão de N_2O transformados pela função $f(x) = \ln(x)$, isto se ocorre principalmente por se trabalhar com nódulos individuais o que torna o coeficiente de variação muito alto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo do potencial de desnitrificação de *Bradyrhizobium*, *in vitro*

4.1.1. Emissão de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium sp.*

Na avaliação do crescimento das bactérias em meio de cultura por 6 dias e incubação durante 6 horas em frasco de cromatografia lacrados, foi constatado que as estirpes estudadas neste trabalho apresentaram diferenças significativas quanto a capacidade de desnitrificação (**Tabela 6**). A produção de N₂O foi maior no meio que continha estirpes pertencentes à espécie *B. japonicum*, quando comparadas aos que continham estirpes de *B. elkanii*. As estirpes de *B. japonicum* USDA 110 e USDA 06, seguidas pelas estirpes utilizadas em inoculantes no Brasil, CPAC 7 e CPAC 15, foram as que obtiveram maiores médias de emissão. Entretanto, entre as estirpes *B. elkanii*, a estirpe SEMIA 587 foi a que apresentou a menor emissão de N₂O. Como tratamento controle existiam frascos contendo apenas o meio de cultura líquido sem bactérias e o valor da emissão de N₂O nestes frascos foi subtraído dos demais tratamentos.

Em um estudo semelhante conduzido por LESSA et al., (2009) verificou-se diferenças entre as emissões de N₂O para as estirpes testadas (CPAC7, CPAC 15, BR 466, BR 2003, BR 2407, BR 1435) e, dentre elas CPAC 15 e CPAC 7 apresentaram altas emissões de N₂O, sendo que CPAC 7 apresentou a maior emissão entre as duas. Conhecidamente, a capacidade de desnitrificar é uma característica de rizóbios de crescimento lento que são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (FERNANDEZ et al., 2008). Do mesmo modo que existem diferenças entre as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, também existem diferenças entre as estirpes de *B. japonicum* quanto ao processo de desnitrificação. Destaca-se também que estirpes de *B. elkanii* parecem ser as mais limitadas geneticamente e, na maioria dos casos são incapazes de reduzir NO₃⁻ além do NO⁻. Entretanto, a relação entre a filogenia e a existência de genes desnitrificantes (*NapA*, *NirK*, *NorC* e *NosZ*) em *Bradyrhizobium* ainda continua sendo um assunto a ser totalmente esclarecido (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a).

Ao se avaliar as emissões de N₂O verificou-se que os resultados se repetiram para a condição com acetileno, sendo que os valores dos fluxos de N₂O encontrados foram sempre superiores a condição sem acetileno apesar de não haver diferenças significativas entre as médias (**Tabela 6**). Estes resultados eram esperados para as estirpes de *B. japonicum*,

devido ao favorecimento quanto à inibição da enzima óxido nítrico redutase pelo gás acetileno (HYNES & KNOWLES, 1982) e, conseqüentemente, inibindo a produção de N_2 , o que explica o maior acúmulo de N_2O (**Figura 3**). SAMESHIMA-SAITO (2006b) ao utilizarem esta técnica em bactérias semelhantes às testadas neste trabalho também encontraram resultados semelhantes, porém ressaltam que vários fatores, tais como pH e temperatura podem contribuir para inativação do processo de desnitrificação.

Neste estudo, os dados de emissão de N_2O foram ajustados para o número de unidade formadora de colônias no meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias, e para o tempo entre o início da incubação e a análise cromatográfica da amostra. Este procedimento foi adotado para que o fator tempo tivesse a menor influência possível sobre os resultados, já que as amostras só podem ser realizadas uma por vez, ocasionando uma grande diferença entre o horário da primeira e a última leitura. Ressalta-se ainda que a metodologia do acetileno permite que se tenha um valor estimado da produção de N_2 entre os dois gêneros de *Bradyrhizobium* através da diferença entre a emissão de N_2O com e sem o gás acetileno. Contudo, a metodologia não impede que a atividade bacteriana ligada ao processo de desnitrificação cesse dentro do frasco. Em função desse efeito, decidiu-se por normalizar os dados de emissão de N_2O em relação ao encontrado para a estirpe USDA 06, tendo-se como base os resultados obtidos por SAMESHIMA-SAITO et al. (2006a), que demonstraram ausência do gene *nosZ*, que codifica a enzima responsável pela redução de N_2O , ou produção de N_2 . Este procedimento possibilitou a determinação da porcentagem de N_2 produzida por cada uma das bactérias conduzidas neste trabalho. Em alguns casos, foram encontrados valores negativos, provavelmente em função da baixa produção de N_2O associada à variabilidade nas análises, indicando que praticamente não houve produção de N_2 . Outras estirpes da espécie *B. elkanii* mostraram uma produção relativa de N_2 positiva, mas em termos absolutos a produção de N_2O foi baixa. Por outro lado, para algumas estirpes como USDA 110, CPAC 7 e CPAC 15 a produção de N_2 correspondeu a 12,71%, 7,95% e 7,78%, respectivamente, da quantidade de N_2O produzida. É válido ressaltar ainda, que estas porcentagens foram comparadas as emissões apresentadas na segunda coluna da **Tabela 5**. A partir destes resultados obtidos pode-se afirmar que existe uma diferença no metabolismo das bactérias avaliadas e que houve uma separação quanto à emissão de N_2O com relação aos gêneros de *Bradyrhizobium*.

Tabela 6. Valores das taxas de emissão de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* *in vitro*, na presença ou ausência de acetileno.

| Estirpe | Sem Acetileno | Com Acetileno | N ₂ O Relativo * | N ₂ O Acet. Relativo * | N ₂ Relativo ** | % N ₂ O *** | % N ₂ **** |
|---|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| (nmole N-N ₂ O/UFC (10 ⁹) /h ⁻¹) | | | | | | | |
| <i>B. elkanii</i> | | | | | | | |
| SM1b | 72,71 aA | 106,99 aA | 21,9 | 15,9 | -6,0 | 137,6 | -37,43 |
| USDA 76 | 28,71 aA | 45,76 aA | 8,7 | 6,8 | -1,8 | 127,03 | -27,03 |
| USDA 46 | 8,82 aA | 13,61 aA | 2,7 | 2,0 | -0,6 | 131,21 | -31,21 |
| USDA 94 | 22,59 aA | 75,72 aA | 6,8 | 11,3 | 4,5 | 60,4 | 39,6 |
| USDA 130 | 49,26 aA | 139,55 aA | 14,9 | 20,8 | 5,9 | 71,47 | 28,53 |
| 29 W | 9,23 aA | 28,10 aA | 2,8 | 4,2 | 1,4 | 66,51 | 33,49 |
| DF 395 | 1,45 aA | 4,28 aA | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 68,59 | 31,41 |
| SEMIA 587 | 2,59 aA | 3,99 aA | 0,8 | 0,6 | -0,2 | 131,43 | -31,43 |
| <i>B. japonicum</i> | | | | | | | |
| USDA 06 | 331,44 bB | 671,07 bA | 100,0 | 100,0 | 0,0 | - | - |
| USDA 110 | 461,56 cB | 1070,62cA | 159,5 | 159,5 | 20,3 | 87,29 | 12,71 |
| CPAC 7 | 409,14 bcB | 899,95 bcA | 123,4 | 134,1 | 10,7 | 92,05 | 7,95 |
| CPAC 15 | 330,03 bB | 724,61 bA | 99,6 | 108,0 | 8,4 | 92,22 | 7,78 |
| CV (%) | 16,91 | | | | | | |
| BRANCO | 7,11 | 9,94 | | | | | |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Em todos os valores foi descontada a emissão de N₂O no branco (meio de cultura puro).

* Normalização dos dados em função da estirpe USDA 06 (100%).

**Subtração dos valores relativos de N₂O produzido, com e sem acetileno.

***Razão entre N₂O relativo e N₂O relativo com acetileno multiplicado por 100.

****Razão entre N₂ relativo e N₂O relativo com acetileno multiplicado por 100.

4.1.2. Amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA e diferenciação de *B. elkanii* e *B. japonicum*

Neste estudo, foi utilizado um ensaio de PCR baseado na amplificação do gene 16S rDNA para discriminar as duas espécies, *B. elkanii* e *B. japonicum* entre doze estirpes capazes de nodular soja. Os resultados obtidos mostram uma diferenciação das estirpes quanto à espécie relacionada e em todos os casos houve amplificação do fragmento do gene 16S de interesse (**Figura 5**).

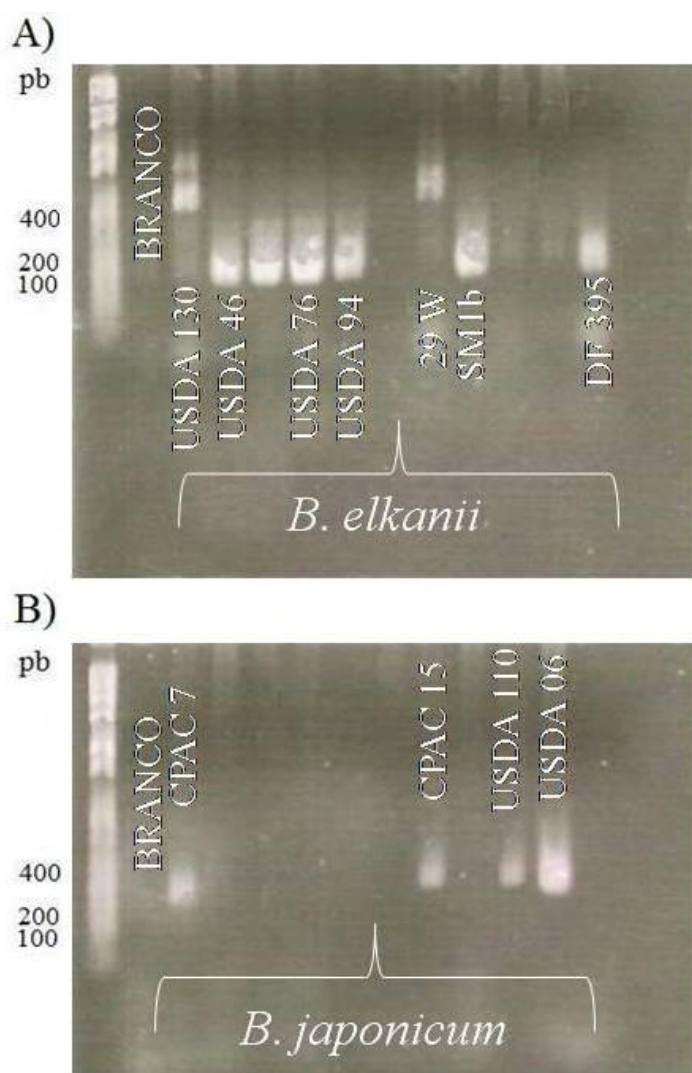


Figura 5. Amplificação de uma região do gene 16S rDNA de 12 estirpes de Bradyrhizobium, utilizando iniciadores específicos. A) A combinação do primer Brady + BElk ; B) A combinação de Brady + BJap. O controle negativo, (branco na figura) foi a reação de PCR sem DNA.

Para efeito de controle, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado nas demais reações, porém sem a adição de DNA na reação, que neste caso, foi chamado de branco. Ressalta-se também não houve amplificação de nenhum material no control, demonstrando que não houve contaminação em nenhuma parte do processo de preparação das amostras (**Figura 5**).

Além deste controle, utilizaram-se, como referência, as estirpes recomendadas para inoculação comercial de soja no Brasil: CPAC 7, CPAC 15, 29W e SEMIA 587, sendo as duas primeiras *B. japonicum* e as últimas *B. elkanii*. Estas estirpes foram utilizadas pelo fato de terem sido extremamente estudadas e classificadas tanto fenotipicamente quanto geneticamente. Esta classificação foi novamente, confirmada utilizando a metodologia proposta neste estudo. Na verdade, todas as estirpes avaliadas já foram classificadas de acordo com suas diferenças genéticas, morfológica ou fisiológica (BODDEY, 1995; BODDEY & HUNGRIA, 1995), sendo que apenas SM1b e DF 395 não haviam sido diferenciadas geneticamente. A figura 5 mostra que houve confirmação destas estirpes como *B. elkanii*.

Desde a década de 1980, vários trabalhos já constatavam a grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *Bradyrhizobium*, o que resultou na subdivisão utilizada atualmente: *B. elkanii* e *B. japonicum* (KUYKENDALL et al., 1992). Posteriormente, Hungria et al. (1994a) demonstraram as principais diferenças morfológicas e fisiológicas entre as duas espécies e as respectivas metodologias para diferenciá-las (HUNGRIA et al., 1994b). Considerando que somente duas espécies de *Bradyrhizobium* são utilizadas como inoculantes no Brasil, muitas vezes se faz necessária a distinção entre elas em estudos referentes à diversidade, capacidade simbiótica, análises moleculares de sistemas bioquímicos e estudos taxonômicos. Os métodos convencionais de classificação fenotípica, baseados em sorologia, foram, por muito tempo, utilizados para diferenciar as espécies pertencentes à família Rhizobiaceae (WEBER et al., 1989; LEUNG et al., 1994; SPRENT, 1997).

Em termos genéticos, as diferenças entre os genótipos foram confirmadas em estudos de sequenciamento dos genes *nifDK* e *nifE* (MINAMYSAWA, 1990; MINASAWA, et al. 1992), por hibridizações do gene *hup* (MINAMYSAWA, 1990; VAN BERKUN, 1990; MINASAWA, et al. 1992) e pelo padrão de restrição com os genes *nod* comuns (*nodYABC*) da estirpe padrão para *B. japonicum*, USDA 110. Contudo, com o desenvolvimento de técnicas moleculares mais modernas, como a

PCR e suas técnicas derivadas (rep-PCR e AFLP), a diferenciação entre espécies, e mesmo entre estirpes de uma mesma espécie, ficou mais precisa (GIONGO et al., 2007).

Desta forma, como o objetivo principal desta parte do estudo foi diferenciar as estirpes avaliadas em *B. elkanii* e *B. japonicum*, a fim de se ter certeza sobre cada uma antes de irem como inoculantes para o campo ou experimentos *in vitro*, a metodologia utilizada mostrou-se eficiente, podendo ser utilizada como mais um recurso quando se tem o objetivo de diferenciar geneticamente espécies de *Bradyrhizobium*.

4.1.3. Amplificação dos genes relacionados à desnitrificação em estirpes de *Bradyrhizobium*, e comparação com resultados de emissão de N₂O.

Ao se investigar a presença de genes relacionados com a desnitrificação (*napA*, *nirK*, *norC* e *nosZ*) no genoma de estirpes pertencentes ao gênero *B. elkanii* e *B. japonicum*, utilizando-se como controle para as reações de PCR e eletroforese em gel de agarose o gene para 16S, confirmou-se em todos os casos sua amplificação (**Tabela 1**). Os resultados obtidos demonstraram com clareza que dentre as estirpes de *B. japonicum* avaliadas neste trabalho todas possuem os genes *napA*, *nirK* e *norC* e, que apenas na estirpe USDA 06 o gene *nosZ*, não foi observado (**Tabela 7 e Figura 6**).

Já para as estirpes de *B. elkanii* não houve um padrão muito claro de presença e ausência dos genes avaliados, sugerindo que a presença dos genes em questão depende de cada estirpe estudada e não do gênero ao qual pertence. No entanto, com exceção da estirpe SM1b, nenhuma apresentou o gene *nosZ*, que codifica a enzima óxido nitroso redutase que é responsável pela conversão de N₂O a N₂. Além disto, apenas 29W e SM1b apresentaram o gene *norC*, gene este que está relacionado com a capacidade de emissão de N₂O (**Tabela 7**). Estes resultados corroboram com os dados obtidos quanto à emissão de N₂O por estas bactérias *in vitro* (**Tabela 6**), já que as estirpes que obtiveram maiores emissões possuem o gene *norC* em seu genoma. Ressalta-se ainda que apesar das estirpes 29W e SM1b terem apresentado este gene e, em contrapartida, não terem apresentado altos valores de emissão de N₂O, ainda assim não é possível dizer a magnitude que é expresso nestas estirpes, sendo que para isto, há necessidade de estudos subsequentes.

LUCINSKI, et al. (2002), assim como FIGURSKI & HELINSKI (1979) citam que existe a possibilidade de ocorrência de um rearranjo genômico durante a evolução de algumas bactérias e que provavelmente genes desnitrificantes podem ter sido inativados

ou excluídos da sequência de DNA. Portanto, a partir desta suposição pode-se presumir a possibilidade de ganho ou perda de algum gene no processo evolutivo de *Bradyrhizobium* sp, embora alguns também possam ter sido conservados, mas se mantendo inativos.

Em um trabalho semelhante, SAMEISHIMA-SAITO et al. (2006a) e SAMEISHIMA-SAITO et al. (2006b) avaliaram a presença destes genes em diversas estirpes isoladas no Japão e algumas consideradas como padrão. Das estirpes testadas neste estudo, quatro foram semelhantes às testadas no presente trabalho, USDA 110, USDA 06, USDA 46 e USDA 76, sendo que para todos os casos os resultados encontrados foram similares. Portanto, os resultados encontrados com a amplificação dos genes desnitrificantes mostram a existência de diferenças genéticas para as estirpes avaliadas, assim como estas diferenças influenciam no potencial desnitrificador, ou seja, na emissão de N₂O por estas bactérias. Em contrapartida, ainda existem dúvidas que precisam ser esclarecidas, principalmente com relação às diferentes condições que possam favorecer a expressão destes genes.

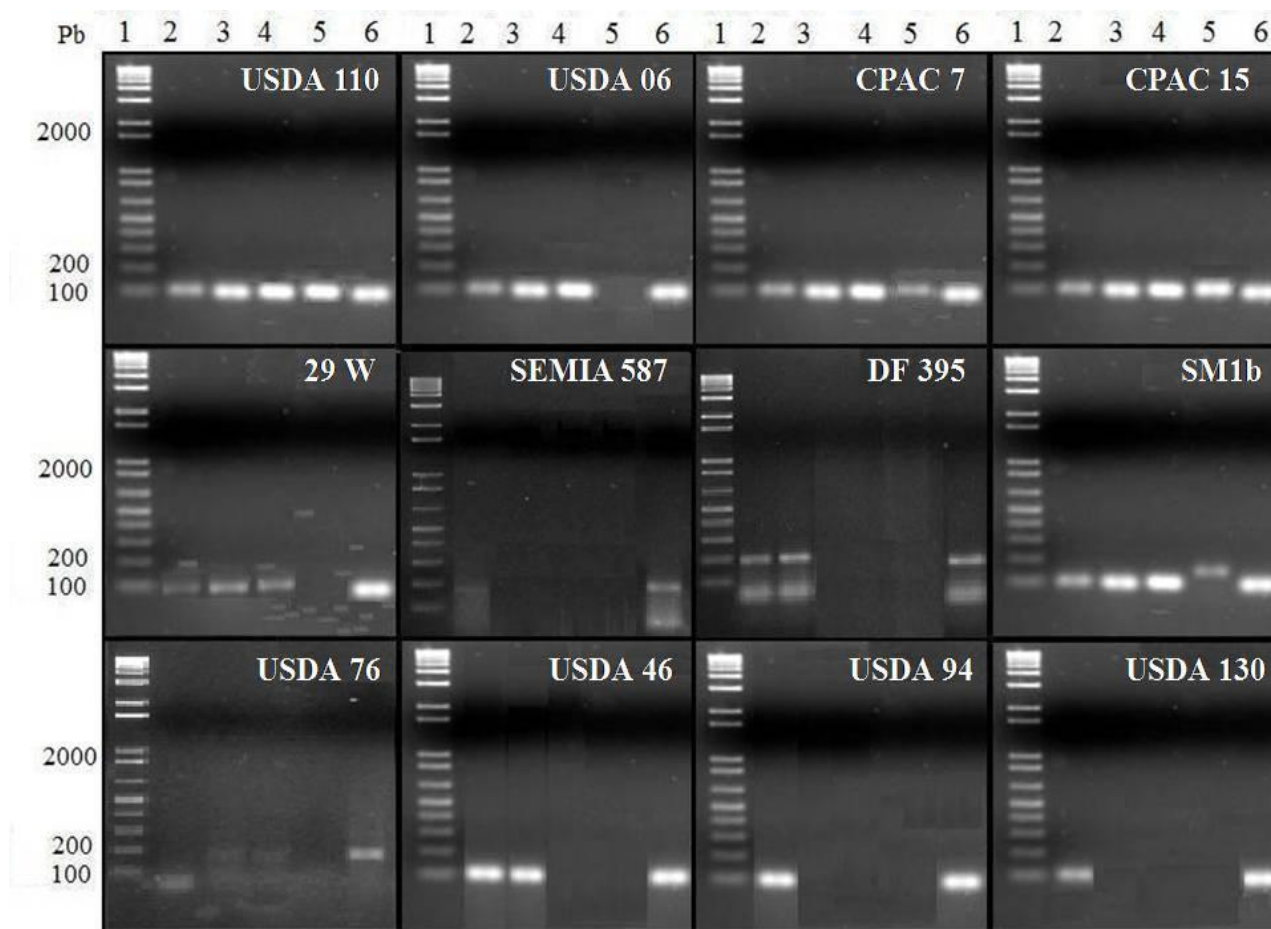


Figura 6. Amplificação por PCR dos genes *napA*, *nirK*, *norC* e *nosZ* utilizando DNA genômico de 12 estirpes de *Bradyrhizobium* e os iniciadores específicos. Após a PCR, 5 µl foram aplicados no gel de agarose 2%. Coluna 1: Padrão de Peso Molecular 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen); Demais colunas representam as combinações de iniciadores utilizados: 2 (BJ *NapAF* + BJ *NapAR*); 3 (BJ *NirKF* + BJ *NirKR*); 4 (BJ *NorCF* + BJ *NorCR*); 5 (BJ *NosZF* + BJ *NosZR*); 6 (BJ *16SF* + BJ *16SR*).

Tabela 7. **Presença dos genes relacionados com a desnitrificação no genoma de *B. japonicum* e *B. elkanii*. Sinal positivo (+) indica presença e negativo (-) indica ausência de cada um dos genes.**

| Estirpes | Genes | | | | Controle |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | <i>napA</i> | <i>nirK</i> | <i>norC</i> | <i>nosZ</i> | <i>16S</i> |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | | | | | |
| USDA 110 | + | + | + | + | + |
| CPAC 7 | + | + | + | + | + |
| CPAC 15 | + | + | + | + | + |
| USDA 06 | + | + | + | - | + |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | | | | | |
| SM1b | + | + | + | + | + |
| 29 W | + | + | + | - | + |
| DF 395 | + | + | - | - | + |
| USDA 46 | + | + | - | - | + |
| SEMIA 587 | + | - | - | - | + |
| USDA 94 | + | - | - | - | + |
| USDA 130 | + | - | - | - | + |
| USDA 76 | - | - | - | - | + |

4.2. Experimento em vasos.

4.2.1. Avaliação da matéria seca, N-total e peso fresco de nódulos de plantas de soja.

As plantas de sojas inoculadas e não inoculada apresentaram diferenças em acúmulo de matéria seca em parte aérea, sendo que as estirpes CPAC 7 e CPAC 15 apresentaram diferença estatística quando comparada com o tratamento não inoculado. Para matéria seca de raiz, as estirpes CPAC 15 e CPAC 7 também apresentaram diferença estatística comparadas com as plantas não inoculadas (**Tabela 8**).

As plantas não inoculadas acumularam quantidades bem menores tanto de matéria seca quanto de N total quando comparadas com as plantas inoculadas, mostrando que a inoculação favoreceu a fixação biológica de nitrogênio. Já ao se avaliar a produção de biomassa seca de parte aérea entre as plantas de soja observou-se maiores valores entre as plantas inoculadas com as estirpes CPAC 15 e CPAC 7 (*B. japonicum*), com 14,08 e

14,52 g vaso⁻¹, respectivamente. O mesmo comportamento foi verificado quanto a acumulação de massa seca total, apresentando valores de 19,34 e 19,78 g vaso⁻¹ para os tratamentos CPAC 15 e CPAC 7 respectivamente, e também para massa fresca nos nódulos, onde apresentou 4,86 g vaso⁻¹ para a estirpe CPAC 15 e 4,96 g vaso⁻¹ para CPAC 7.

As estirpes 29W e SEMIA 587 (*B. elkanii*) apresentaram médias para acúmulo de matéria seca total de 15,62 e 14,42 g. vaso⁻¹, respectivamente.

Tabela 8. Acúmulo de matéria seca e nitrogênio total em parte aérea, e matéria fresca de nódulos de plantas de soja inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* sp.

| | Parte Aérea | Raiz | Nódulos |
|-----------|--|---|---------|
| Estirpe | Matéria Seca (g. vaso ⁻¹) | Matéria fresca (g. vaso ⁻¹) | |
| CPAC 15 | 14,08b | 5,26b | 4,86b |
| CPAC 7 | 14,52b | 5,26b | 4,96b |
| 29W | 11,84ab | 3,78ab | 4,22b |
| SEMIA 587 | 10,34ab | 4,08ab | 4,03b |
| NÃO INOC. | 6,20a | 2,64a | 2,14a |
| CV(%) | 10,05 | 28,94 | 17,48 |
| | Nitrogênio total (mg. vaso ⁻¹) | | |
| CPAC 15 | 410bc | 94b | - |
| CPAC 7 | 440c | 90ab | - |
| 29W | 250ab | 66ab | - |
| SEMIA 587 | 390bc | 66ab | - |
| NÃO INOC. | 210a | 50a | - |
| CV (%) | 33,25 | 44,64 | - |

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Ao se avaliar o acúmulo total de N, os resultados demonstram uma relação positiva entre acúmulo de massa seca e N. Sendo, portanto, os tratamentos CPAC 15 e CPAC 7 os que apresentaram maiores médias tanto para parte aérea quanto para raízes, chegando a valores totais de 504 e 530 mg N vaso⁻¹, respectivamente (**Tabela 8**).

Comparando-se o acúmulo de N e produção de massa seca em parte aérea e raiz na soja inoculada com as estirpes de *B. japonicum* (CPAC 15 e CPAC 7), com as inoculadas com as estirpes de *B. elkanii* (29W e SEMIA 587), observa-se que as estirpes de *B. japonicum* apresentaram maiores valores médios.

Para o peso fresco de nódulos, não se observou diferenças entre as plantas de soja inoculadas. Estes resultados não foram relatados anteriormente (DOBEREINER, et al., 1970; NEVES, et al. 1985, GUIMARÃES, 2005). Estes trabalhos mostraram que o peso seco de nódulos de SEMIA 587 e 29W poderia ser o dobro de CPAC 7 e CPAC 15 e que o N total nos nódulos pode ser, em média, 75% mais alto.

Em trabalho semelhante, OKITO et al. (2004) também encontraram resultados similares, porém bem mais evidenciados, com plantas de soja cv. Celeste acumulando 950 mg N vaso⁻¹ na parte aérea, e 56 mg N vaso⁻¹ nos nódulos quando inoculada com a estirpe CPAC 7, enquanto que quando inoculada com a estirpe 29W apresentou 679 mg N vaso⁻¹ e 125 mg N vaso⁻¹ também para parte aérea e nódulos, respectivamente.

SANTOS et al. (1997) estudando plantas de soja da cv. Doko inoculadas com as estirpes BR 33 (CB 1809) e 29 W, sob diferentes intensidades luminosas (luz total e 70% de luminosidade), também encontraram diferenças entre as estirpes, mais evidenciadas do que as observadas no presente trabalho. Para BR 33 quando conduzida sob luz total, estes autores encontraram 39,9 g planta⁻¹ de massa seca (folhas, hastes e vagens) com 613,3 mg N planta⁻¹. Enquanto, as plantas inoculadas com 29 W apresentaram médias de 29,2 g planta⁻¹ com 482,5 mg N planta⁻¹.

A ausência de diferença encontrada neste trabalho pode estar relacionada com a época da implantação do experimento, a qual não coincidiu com a época de plantio recomendado para a cultura, podendo o crescimento ter sido afetado pelo fotoperíodo. Entretanto, é possível inferir que as estirpes de *B. japonicum* foram mais eficientes na nodulação, pois apresentaram maior massa seca. DOBEREINER et al. (1970), NISHI & HUNGRIA (1996), mostraram que CPAC 7 (variante da estirpe CB1809) mostrou-se mais eficiente na fixação de N₂ do que 29W.

Resultados encontrados por NEVES et al. (1985) também mostraram que a concentração de ureídeos na seiva e a translocação do N fixado para os grãos nas plantas inoculadas com CB 1809 eram maiores que nas plantas inoculadas com 29 W.

EVANS et al. (1982) e HUNGRIA et al. (1989) encontraram que as estirpes de *B. japonicum* foram mais eficientes quanto a acréscimos em massa seca total, sendo que características fisiológicas e morfológicas provavelmente favoreceram essa maior produção de matéria seca e acúmulo de N.

4.2.2. Emissões de N₂O por plantas de soja.

Os fluxos de N₂O observados no experimento de soja em vasos foram relativamente altos, sendo os maiores da ordem de 700 µg N-N₂O m⁻²h⁻¹ para plantas inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. Já para as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*, estes valores não passaram de 500 µg N-N₂O m⁻²h⁻¹ (**Figura 7**). O aumento nos fluxos de óxido nitroso começaram a ser observados a partir do oitavo dia após o plantio, mantendo-se próximo de 200 µg N-N₂O m⁻² h⁻¹ para CPAC 7 e CPAC 15 e, abaixo de 100 µg N-N₂O m⁻² h⁻¹ para 29 W e SEMIA 587 durante praticamente todo o período de avaliação.

Os maiores fluxos ocorreram no intervalo entre 20 e 30 dias após o plantio, sendo que estes valores podem estar relacionados com o período após a formação dos nódulos, ou seja, início de sua atividade. Fenologicamente, os primeiros nódulos radiculares na soja são visíveis a partir de dez a quinze dias após a emergência das plantas (estádios V1 a V2), dependendo da boa especificidade entre a cultivar de soja e a estirpe de bactéria, além de condições favoráveis de ambiente e manejo (CÂMARA, 1992; CÂMARA, 1998).

Os valores de emissão de N₂O encontrados neste estudo diferem dos encontrados por Oliveira (2009), onde os maiores fluxos em plantas de soja inoculadas no campo foram 100 µg N-N₂O m⁻² h⁻¹. Esta diferença pode estar relacionada com as condições de cultivo, que para este estudo foi em vaso preenchido com solo previamente destorroado e peneirado, destruindo a estrutura do solo, o que pode ter favorecido a menor aeração do solo, condicionando maior desnitrificação.

O preparo do solo é um fator que pode disponibilizar maiores quantidades de N derivados da mineralização da matéria orgânica do solo, o que pode ter influenciado na magnitude dos fluxos de N₂O deste estudo. Ressalta-se que a produção de N₂O pode ter sido afetada por diversos fatores, um deles é a taxa de N mineralizado no solo, além de variáveis como conteúdo de carbono orgânico decomponível, pH e parâmetros físicos do solo que controlam sua difusão através da matriz (ROCHESTER, 2003; STEHFEST & BOUWMAN 2006; PEOPLES et al. 2009). Outro fator que pode ter favorecido os altos fluxos é o fato de o inoculante utilizado ser preparado com apenas uma bactéria de interesse em cada tratamento, desempenhando isoladamente seu potencial desnitrificante e ficando em maior quantidade no solo. Em experimentos como os de CARDOSO et al. (2008), também em vasos, utilizou-se um coquetel com as

estirpes atualmente recomendadas no país para inoculação de soja, podendo ter havido subestimação dos resultados, que ficaram abaixo dos encontrados neste estudo, cerca de $50 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2}\text{h}^{-1}$.

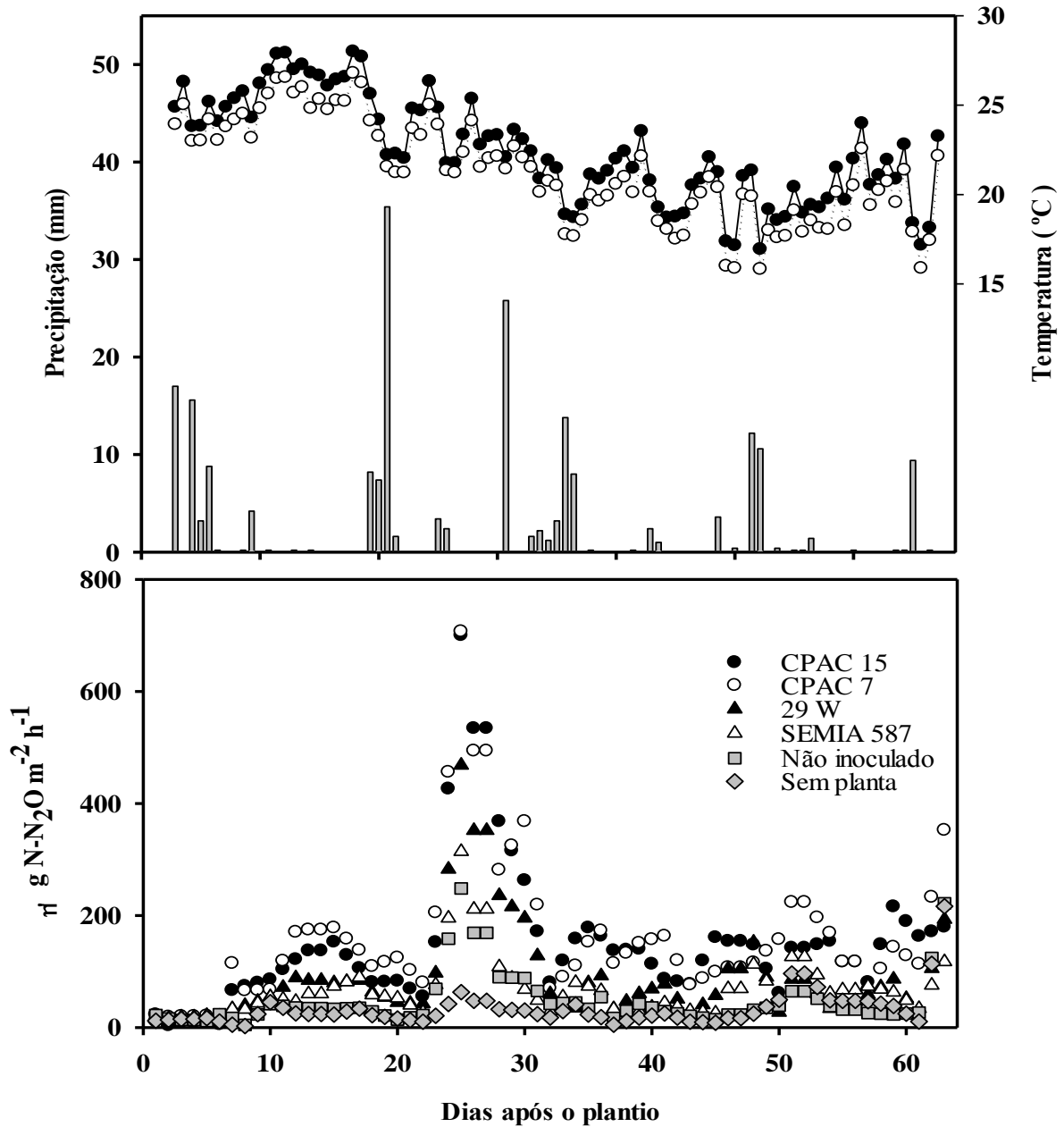


Figura 7. Temperatura, precipitação e fluxo médio diário de N_2O nos tratamentos inoculados com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (CPAC 15 E CPAC 7), *B. elkanii* (29 W e SEMIA 587), sem inoculação e sem planta.

Durante a condução do experimento houve períodos em que não ocorreram chuvas (**Figura 7**), o que poderia impossibilitar que as bactérias pudessem expressar seu máximo potencial desnitrificador. Por isso, para determinar o potencial de desnitrificação

associado à inoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, durante todo o período sem precipitação, o solo foi irrigado de forma que ficasse todo tempo bem úmido, pois altos níveis de água no solo em curto intervalo de tempo promovem a rápida ativação de bactérias (DICK et al., 2001). Esta irrigação foi feita de forma que o solo não ficasse encharcado, pois isto poderia atrapalhar o desenvolvimento das plantas.

Em trabalhos com resíduos vegetais no solo, LUNDQUIST et al. (1999), encontraram fluxos de N₂O inicialmente mais elevados, reduzindo a intensidade após algumas semanas de avaliação. A menor intensidade dos fluxos de N₂O comparados aos seus experimentos anteriores foi devido ao menor regime de chuvas que ocorreu durante o período, com pequenas precipitações e maior intervalo entre elas, mantendo a umidade do solo a níveis muito baixos, reativando a atividade das bactérias com a chuva, mas com intensidade menor que o efeito em altas precipitações.

As emissões médias acumuladas nos tratamentos inoculados durante os 63 dias de avaliações foram estatisticamente diferentes dos tratamentos não inoculados e sem planta (**Figura 8**), mostrando que os fluxos de N₂O podem ser influenciados direta ou indiretamente pelas estirpes utilizadas. Na verdade, alguns autores já sugeriram que fatores biológicos como a FBN podem ser importantes na emissão de N₂O (MOSIER et al., 1996; MOSIER, 1998).

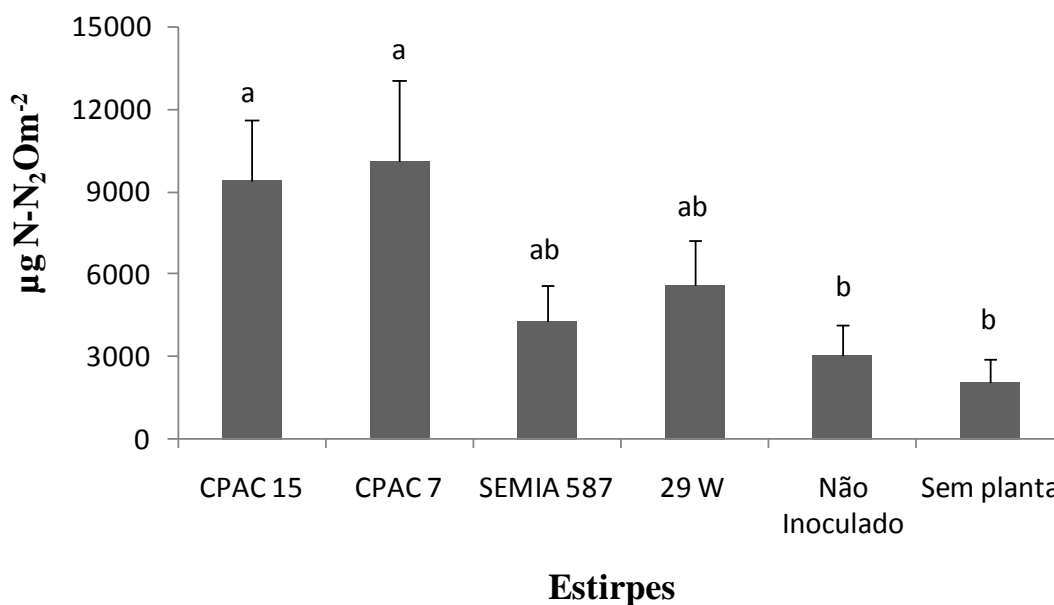


Figura 8. Óxido nítrico acumulado emitido em 63 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student. As barras representam o erro padrão da média.

A afirmação original que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser uma importante fonte de emissão de N₂O durante o crescimento de leguminosas está ligada a revisão de literatura de BOUWMAN (1996) que inclui resultados de estudos realizados em 1980, onde se encontrou emissões relativamente altas, geradas por leguminosas. Mais tarde estes resultados foram apoiados com o surgimento de evidências de que algumas cepas de rizóbio possuíam nitrato e nitrito redutase e seriam capazes de desnitrificar NO₃ a N₂O, *in vitro*, na forma de vida livre, em nódulos radiculares de leguminosas ou como bacteróides (O'HARA & DANIEL, 1985; VAN BERKUN & KAYSER, 1985; SMITH & SMITH, 1986). Contudo, outros estudos como os de CIAMPITTI et al. (2008) não encontraram emissões significativas durante a fase inicial de cultivo e atribuíram os maiores índices de emissão de N₂O ocorridos entre as fases de enchimento de grão e maturação à liberação do N vindo da decomposição de raízes e nódulos .

No entanto, ainda não existe um consenso nesse sentido, pois existem estudos que mostram que o plantio de soja estimula a emissão de N₂O (YANG & CAI, 2005), o que estaria associado ao sistema simbiótico da cultura. No Brasil, esse efeito não foi confirmado (ALVES et al., 2010), embora ainda caiba a hipótese de que a utilização de estirpes de *B. elkanii* nos inoculantes, mais competitivas nesse sentido, poderiam estar ocupando grande parte dos nódulos, o que explicaria as baixas emissões de N₂O relatadas.

Os resultados encontrados neste estudo seguem a mesma tendência dos resultados obtidos no experimento realizado *in vitro*, em meio de cultura, mostrando que de fato, pode existir uma diferença entre as emissões quanto as estirpes de *Bradyrhizobium* sp.. Em ambos os casos as bactérias de *B. japonicum* superaram as emissões de estirpes de *B. elkanii* (**Figura 8**) e confirmam os resultados da amplificação por PCR dos genes *napA*, *nirK*, *norC* e *nosZ* para CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W apresentados anteriormente (**Figura 6 e Tabela 7**). Contudo, não se pode afirmar que a emissão de N₂O está exclusivamente ligada á bactéria utilizada no inoculante pois obteve-se valores para emissão, mesmo que em menores proporções, nos tratamentos sem inoculação e sem planta, possivelmente de bactérias desnitrificantes já presentes no solo.

4.2.3. Consumo de nitrato, produção de nitrito, e emissão de N₂O pelos nódulos em solução.

O objetivo dessas avaliações foi observar como as estirpes em estudo se comportam em meio rico em nitrato quanto ao consumo deste nitrato presente no meio,

produção de nitrito e emissão de óxido nitroso. Desse modo pretendia-se avaliar as fases de desnitrificação nessas bactérias, onde o consumo de nitrato estaria ligado a nitrato redutase e produção de nitrito e, a emissão de N_2O estaria ligada a atividade da óxido nítrico redutase. Ciclo já apresentado anteriormente (**Figura 2**).

Não houve um padrão nos resultados encontrados para as estirpes nos quatro dias de avaliação (**Figura 9**). Na verdade, os resultados podem ter sido influenciados pelo tempo, já que o cromatógrafo só consegue fazer uma leitura por vez e a diferença entre o tempo da leitura do primeiro frasco e o último é relativamente grande e, apesar dos dados serem ajustados em função deste fator, a atividade das bactérias presentes nos nódulos dentro do frasco continuava ativa.

Isto fica claro nos resultados encontrados para CPAC 7 na primeira coleta, CPAC 15 na segunda e terceira coleta e principalmente nos dados de não inoculado, em que a quantidade de nitrato restante foi muita baixa em relação a que foi adicionada (**Figura 9**). Outros fatores que impedem uma análise mais aprofundada dos resultados, é que não foi avaliada a produção de óxido nítrico (NO) e N_2 , que são outros produtos da ação enzimática envolvida na desnitrificação. O NO é o produto da redução do NO_2^- , e também o substrato para produção de N_2O . A redução de N_2O produz N_2 . Como não foi possível avaliar a produção de NO e N_2 , não se sabe se a quantidade não recuperada do N (fração “outro” na Figura 9) inicialmente fornecida na forma de nitrato é produto da redução de NO_2^- , ou redução de N_2O , ou mesmo dos dois processos.

Vários autores já demonstraram que vários parâmetros têm influencia sobre a atividade de desnitrificação em solos, tais como espaço poroso, pH e disponibilidade de nitrato. Segundo VAN SPANNING et al. (2007), isto também é uma verdade para a razão dos produtos finais da desnitrificação em simbiose, já que cada passo no caminho pode ser diferencialmente regulado ou influenciado por diferentes parâmetros ambientais.

Além disso, a influência do pH sobre a atividade da enzima óxido nitroso redutase tem sido observada em alguns estudos onde um menor pH inibiu a atividade do gene *nosZ*, resultando em produções de N_2O superestimadas por acúmulo (BERGAUST et al, 2010; THOMSEN et al., 1994). Portanto, serão necessários novos estudos, assim como outro tipo de abordagem além dessas avaliações para que se consiga entender melhor o funcionamento de cada fase da desnitrificação em estirpes de *Bradyrhizobium sp.*

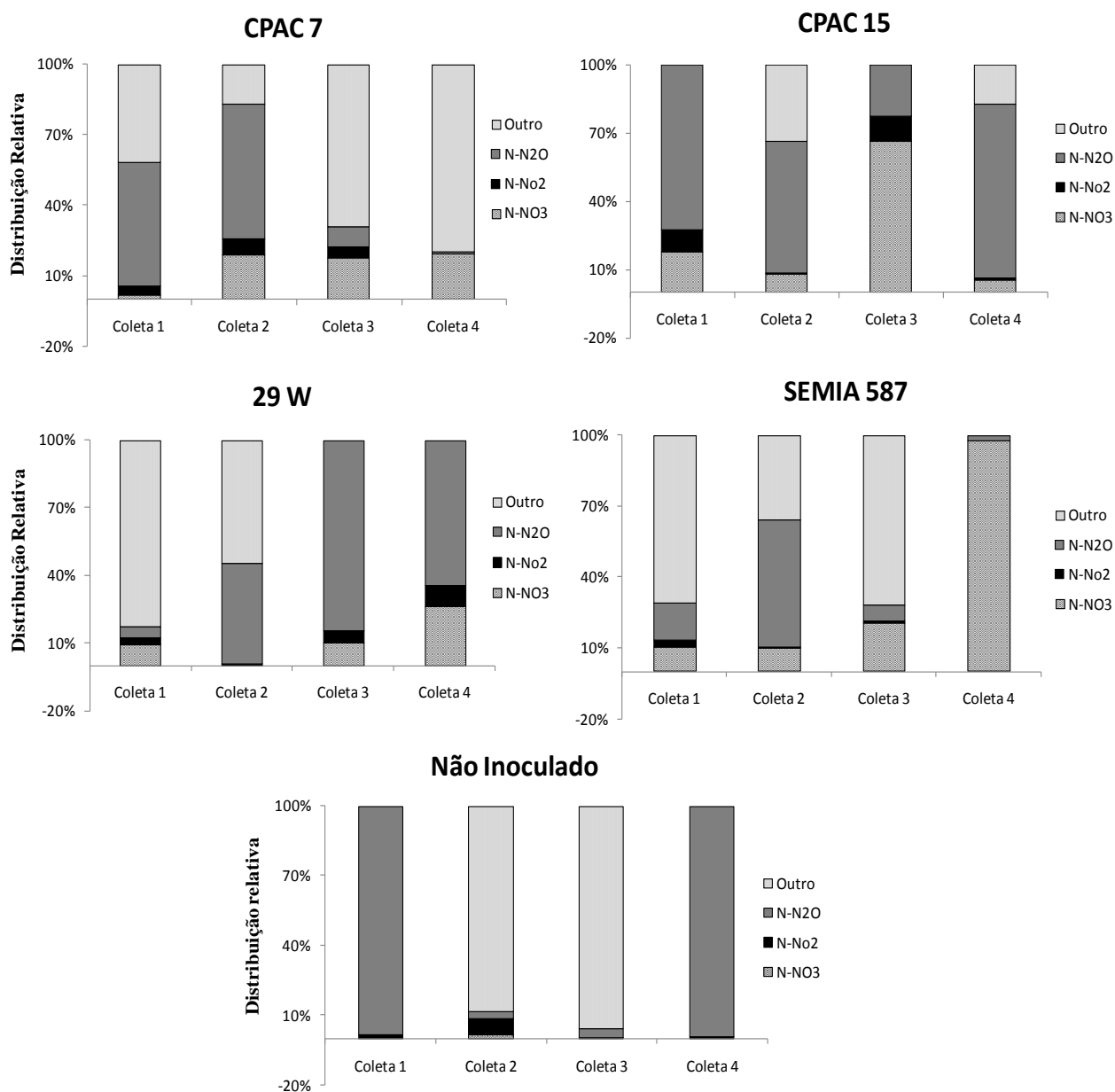


Figura 9. Consumo de nitrato, produção de nitrito, e emissão de N_2O pelos nódulos relativos a uma solução de Nitrato 10ppm

4.2.4. Análise de consumo de N_2O pelos nódulos

A análise de consumo de N_2O foi realizada com o objetivo de se ter mais um resultado que indicasse se existe diferença entre a capacidade de produção de N_2 pelas bactérias avaliadas. Neste sentido esperava-se que apenas as estirpes que possuem o gene *nosZ* (CPAC 7 e CPAC 15) fossem capazes de diminuir a concentração de N_2O que foi adicionada ao frasco de cromatografia previamente.

A **figura 10** mostra que isto não aconteceu como esperado, sendo que para todas as estirpes, em pelo menos uma das quatro coletas a quantidade de N_2O adicionada diminuiu, demonstrando ação da óxido nitroso redutase (produção de N_2). Isto ocorreu inclusive onde se tinham nódulos da planta não inoculada, sendo que estes nódulos podem ser atribuídos a associação com bactérias nativas e que estavam presentes no solo. Além de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, existe também a possibilidade de outras bactérias desnitrificantes estarem atuando no solo, já que este não era estéril. Dessa forma, existe a chance destas bactérias estarem ocupando parte dos nódulos, ao invés da estirpe inoculada, e assim contribuindo com parte da redução de N_2O para N_2 , o que pode explicar a variabilidade dos dados.

Na verdade, CHÈNEBY et al. (1998), também encontraram um resultado não esperado ao se avaliar dois solos distintos quanto a diferenças na presença de bactérias desnitrificantes. Constatou-se que o solo com as maiores emissões de N_2O possuía uma maior proporção de organismos com capacidade desnitrificante para N_2 e não obtiveram nenhuma correlação para a presença dos genes *nosZ* e uma capacidade de consumo de N_2O . A presença desse gene deveria fazer com que o processo de desnitrificação chegasse ao seu final, ou seja, emitisse mais N_2 do que N_2O , mas assim como neste estudo isto não ocorreu consistentemente.

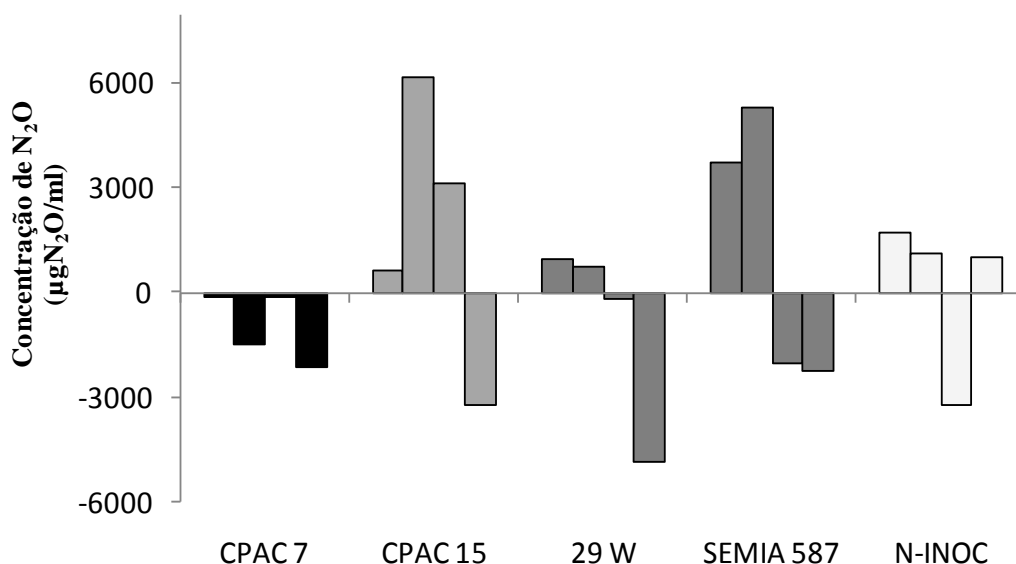


Figura 10. Consumo de N_2O por estirpes de *Bradyrhizobium* sp.. Cada barra representa um dia de coleta.

Apenas a estirpe CPAC 7 apresentou um padrão para os resultados, com consumo de N_2O , e consequente produção de N_2 , para os quatro dias de coleta, apresentado como valores negativos de contração de N_2O (**Figura 10**).

Este consumo de N_2O tem sido observado para uma variedade de organismos terrestres (CHAPUIS-LARDY et al., 2007), no entanto o mecanismo exato de funcionamento ainda é desconhecido. Trabalhos anteriores mostram que o consumo de N_2O é maior quando não existe limitação de nitrato no meio (ROSENKRANZ et al., 2006). Mas estudos com curtos períodos de incubação de estirpes associados a altas concentrações de nitrato (JONES, 2010) sugerem que outros fatores também podem ser importantes.

CAVEGELLI & ROBERTSON (2001) demonstraram um efeito sobre o consumo de N_2O em comunidades desnitrificantes, onde cada comunidade era diferencialmente regulada por fatores como pH e disponibilidade de oxigênio. Portanto, fatores não esperados ou não observados podem ter prejudicado os resultados esperados neste trabalho. Experimentos que possam elucidar os mecanismos da redução do N_2O até N_2 são necessários para melhor entender o potencial de algumas bactérias atuarem como mitigadoras no processo de emissão de N_2O principalmente em sistemas com leguminosas.

5. CONCLUSÕES

A amplificação do gene 16S rDNA se mostrou eficiente para a separação de estirpes de *Bradyrhizobium* sp.

A emissão de N₂O juntamente com a amplificação dos genes desnitrificantes presentes em DNA genômico de estirpes de *Bradyrhizobium* sp., crescidas em meio de cultura puro, mostrou a existência de diferenças genética para as estirpes, assim como, influência na emissão de N₂O por estas bactérias.

Estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* tendem a emitir menos N₂O quando comparadas a plantas igualmente inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da emissão de N₂O juntamente com a amplificação dos genes desnitrificantes presentes em DNA genômico de estirpes de *Bradyrhizobium* sp., crescidas em meio de cultura puro, mostrou a existência de diferenças genética para as estirpes, assim como, estas diferenças podem influenciar no potencial desnitrificador, ou seja, na emissão de N₂O por estas bactérias.

A amplificação do gene 16S rDNA utilizando iniciadores específicos para diferenciar *B. elkanii* e *B. japonicum* se mostrou eficiente para as estirpes avaliadas neste estudo, podendo ser utilizada como mais um recurso para diferenciar geneticamente espécies de *Bradyrhizobium* sp..

Os resultados de emissão de N₂O do solo cultivado com plantas de soja inoculadas com 2 estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* e 2 estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, em vasos, mostraram que existe diferença entre as emissões associado à estirpe utilizada.

No entanto, é preciso ressaltar que mecanismos e interferências além das controladas neste estudo podem influenciar os resultados obtidos, principalmente no que diz respeito ao controle de bactérias com potencial desnitrificador já existentes no solo utilizado. Portanto recomenda-se que sejam realizados novos experimentos que possam melhor elucidar os mecanismos de emissão e consumo de N₂O, e que ajudem a melhor entender o funcionamento de cada fase da desnitrificação em estirpes de *Bradyrhizobium* sp. procurando-se identificar algumas bactérias que possam atuar também como mitigadoras no processo de emissão de N₂O em sistemas agrícolas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R., BODDEY R. M. & URQUIAGA, S. The success of soybean in Brazil. *Plant and Soil*, v. 252, p. 1-9. 2003.

ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA/SPI, p. 449-470, 1994

ALVES, B.; CARDOSO, S. A.; LESSA, A. C. R.; PAREDES, D.; JANTALIA, C. P.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; A fixação biológica de nitrogênio não é uma fonte direta de N₂O nos sistemas agrícolas. Comunicado Técnico 125, Embrapa Agrobiologia, 2010.

BAGGS, E. M.; REES, R.M., SMITH K.A., VINTEN J.A. Nitrous legume oxide emission from soils after incorporating crop residues. *Soil Use Manage.* vol. 16, p. 82-87, 2000.

BAGGS, E.M. et al. Nitrous oxide release from soils receiving N-rich crop residues and paper mill sludge in eastern Scotland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.90, p.109-123, 2002.

BAIRD, C. Química Ambiental. Trad. RECEIO, A. M. L. e CARRERA, L. C. M., 2^a ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.

BALL, B.C. et al. Field N₂O, CO₂ and CH₄ fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. *Soil & Tillage Research*, v.53, p.29-39, 1999.

BAYER, C. et al. Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO₂. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.599- 607, 2000.

BERGAUST, L.; SHAPLEIGH, J.; FROSTEGARD, A; and BAKKEN, L. Transcription and activities of NO_x reductases in *Agrobacterium tumefaciens*: the influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental Microbiology* v.10, 3070-3081, 2008

BEZERRA, A. A. C. Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 105p, 1997.

BODDEY, L. H. Determinação das características das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* nas estirpes brasileiras noduladoras da soja. Universidade Estadual de Londrina, 130p, 1995.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Classificação das estirpes de soja utilizadas em estudos e/ou inoculantes brasileiros nas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. In. HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S., Eds. Microbiologia do solo: desafios para o século XXI, IAPAR/Embrapa- CNPSo, p. 332-339, 1995.

BORTOLAN, S.; BARCELLOS, F. G.; MARCELINO, F. C.; HUNGRIA, M., Expressão dos genes nodC, nodW, e nopP em *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 15 avaliada por RT-qPCR, Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.44, p. 1491-1498, 2009.

BOUWMAN, A.F. Direct emissions of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 46, p. 53-70, 1996.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F.J. *Chromatographic methods*. 5.ed. Dordrecht: Kluwer, 1999. p.165-257.

BREMMER, J. M.; ROBBINS, S. G.; BLACKMER, A. M. Seasonal variability in emission of nitrous oxide from soil. *Geophysical Research Letters*, v. 7, p. 641-644, 1980.

CÂMARA, G. M. S.; MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E. A. M. CÂMARA, G. M. S.; Ecofisiologia da cultura da soja. In: (Org.) Simpósio sobre cultura e produtividade da soja. Piracicaba-SP, 1991. Anais. Piracicaba-SP, p. 129-142, 1992

CÂMARA, G.M.S; Inoculação das sementes de soja. In: Soja: tecnologia da produção. Piracicaba: p. 278-293, 1998

CARDOSO, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; SOARES, L. H. B. Uma evidência de que a FBN não é uma fonte direta de N₂O na cultura de soja. In: Reunião Brasileira De Fertilidade Do Solo E Nutrição De Plantas, 28., Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 12., Simpósio Brasileiro De Microbiologia Do Solos, 10., Reunião Brasileira Brasileira de Biologia Do Solo, 7., 2008, Londrina. *Fertbio: Desafios para o uso do solo com deficiência e qualidade ambiental: Anais. Londrina: Embrapa Soja:SBCS:IAPAR, UEL, 2008*

CAVIGELLI, M.; and ROBERTSON, G., Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* v. 33, p. 297-310, 2001.

CERRI, C. E. P.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. C.; BERNOUX, M.; CERRI, C. C. Seqüestro de carbono em áreas de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, Viçosa. Anais. Viçosa: UFV, p. 73-80. 2006.

CHAPUIS-LARDY, L.; WRAGE, N.; METAY, A.; CHOTTE, J. and BERNOUX, M. Soils, a sink for N₂O A review. *Global Change Biol* ,v. 13, p.1-17, 2007.

CHÈNEBY, D.; HARTMANN, A.; HÉNAULT, C. ;TOPP, E. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils. *Biology and Fertility*, 1998.

CHENG, W. et al. N₂O and NO production in various chinese agricultural soils by nitrification. *Soil Biology Biochemistry*, v.36, p.953-963, 2004.

CHOUDHARY, H.A. et al. Nitrous oxide emissions from New Zealand cropped soil; Tillage effects, spatial and seasonal variability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*,v.93, p.33-43, 2002.

CHUEIRE, L.M.O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, p.883-840, 2003.

CIAMPITTI, I. A., CIARLO, E. A. CONTI, M. E. Nitrous oxide emissions from soil during soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crop phenological stages and stubbles decomposition period. *Biologic Fertility of Soils*. v. 44, p. 581-588, 2008.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Avaliação da Safra Agrícola 2010/2011. Acesso: 17 de agosto de 2011 <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4levsafra.pdf>.

COP15 – UNITED NATIONS CLIMATE CHANGE CONFERENCE. Copenhagen, Dinamarca (2009). Disponível em: (<http://en.cop15.dk/frontpage>). Acesso: 16-12-2010.

COSTA, F. S., GOMES, J., BAYER, C., MIELNICZUK, J., Métodos para avaliação das emissões de gases do efeito estufa no sistema solo - atmosfera. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.2, mar-abr, 2006.

DELGADO, M.J., N. BONNARD, A. TRESIERRA-AYALA, E.J. BEDMAR AND P. MÜLLER, The Bradyrhizobium japonicum napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology*, v.149, p. 3395–3403, 2003.

DENMEAD, O.T.; RAUPACH, M.R. Methods for measuring atmospheric gas transport in agricultural and forest systems. In: HARPER, L.A. et al. (ed). *Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change*. Madison: ASA, CSSA e SSSA, 1993. p.19-43. (ASA Spec. Publ.55).

DESJARDINS, R.L. AND RIZNEK, R., Agricultural greenhouse gas budget. In: *Environmental Sustainability of Canadian Agriculture: Report of the Agri-Environmental Indicator Project*. McRae, T., C.A.S. Smith and L.J. Gregorich (eds.) Catalogue No. A22-201/2000E. Agriculture and AgriFood Canada, p. 133-142, 2000.

DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Série Agronomia, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970.

DUXBURY, J. M.; SMITH, M. S.; DORAN, J. M. Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. In: COLEMAN, D. C.; OADES, J. M.; UEHARA. G (Ed.) *Dynamics of soil organic matter en tropical ecosystems*. Hawaii: University of Hawaii, p. 33-67, 1994.

EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Applied Environ Microbiol*, v.58, p. 1809-1815, 1992.

EMBRAPA, Manual de métodos de análises de solo. Rio de Janeiro, Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997

ETCHEBEHERE, C. Ecologia Microbiana e Ciclos Biogeoquímicos. Florianópolis, Brasil: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos, 2005.

EVANS, H. J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M. A.; RUSSEL, S. A.; HANUS, F. J. The present status of hydrogen recycling in legumes. *Israel Journal of Botany*, v.31, p. 72-88, 1982.

FAO-FAOSTAT, Database Results, <http://apps.fao.org>, (19/12/2008)

FERNANDES, S.A.P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. *Geoderma*, v.107, p. 227-241, 2002

FERREIRA, E. S. Cinética Química e Fundamentos dos Processos de Nitrificação e Desnitrificação Biológica. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

FIGURSKI, D. H.; HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, p. 1648–1652, 1979.

FLESSA, H. et al. N₂O and CH₄ fluxes in potato fields: automated measurement, management effects and temporal variation *Geoderma*, v.105, p.307-325, 2002.

FRANCO, A. A. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil: Uma lição para o futuro, *Boletim Informativo da SBSCS*, janeiro - abril, 2009

FRED, E. B.; GRAUL, E. J.; McCOY, E., *Root nodule bacteria of leguminous plants*. Madison: The University of Wisconsin Press, 343p., 1932.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A., *Yeast Extract – Mannitol Agar Laboratory Manual of General Microbiology*, 145p, 1928.

GARCIA-PLAZOLA, J. I.; BECERRIL, J. M.; ARRESE-IGOR, C.; HERNANDEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; APARICIO-TEJO, P.M. The contribution of *Rhizobium meliloti* to soil denitrification. *Plant Soil*, v. 157, p. 207–213, 1993.

GARCIA-PLAZOLA, J. I.; BECERRIL, J. M.; ARRESE-IGOR, C.; HERNANDES, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; APARICIAOTEJO, P. M. The contribution of *Rhizobium meliloti* to soil denitrification. *Plant and Soil*, v. 157, p. 207-213.1993

GELFAND, D. H. In Erlich, H. A. (ed.) *PCR Technology*. Stockton Press, NY, p.17, 1989.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; FREIRE, J. R. J.; ZANETTINI, M. H. B.; Passaglia, L. M. P. Amplification of 16S rRNA gene sequences to differentiate two highly related bradyrhizobia species. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1361-1364, 2007

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; FREIRE, J.R.J.; SÁ; E.L.S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biology Fertile Soils*, in press. 2007.

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; DELEY, D. J.; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B., STRIJDOM, B.W.; YOUNG, J. P. W. Proposal minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal System Bacteriology*, p. 41:582-587, 1991.

GUIMARAES, A. P., Determinação do coeficiente isotópica de ^{15}N relacionado ao processo de fixação biológica de nitrogênio em soja. Dissertação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 47p., 2005

HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal Microbiology*, v.38, p. 1009-1015, 1992.

HARROW, S. A.; RAVINDRAN, V.; BUTLER, J. W.; MARSHALL, J. W., TANNOCK, G. W., Real time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from broiler chickens to determine the influence of farming practices. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, p. 7123-7127, 2007

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

HOLSTEN, R. D.; BURNS, R. C.; HARD, R. W. F.; HERBERT, R. R. Establishment of symbioses between *Rhizobium* and plant cells in vitro. *Nature*, v. 323, p. 173-175, 1971.

HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; VAN DER LINDEN, P. J.; DAI, X.; MASKELL, K.; JOHNSON, C. A. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 881 p, 2001.

HUNGRIA, M., R. J. Campo, and I.C. Mendes. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Embrapa Soja/Embrapa Cerrados, Londrina, Brazil. (Circular Técnica, 13) 2001.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; BALOTA, E. L. COLOZZI FILHO, A. importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo. Londrina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 9 p., (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado técnico, 56). 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T., Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, which an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SHUET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica de nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., Eds *Microorganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI, p. 9-89, 1994a

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SHUET, A. R.; PERES, J. R. R., MENDES, I. C. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., Eds. *Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI, p. 285-325, 1994b.

HUTCHINSON, G.L.; LIVINGSTON, G.P. Use of chamber systems to measure trace gas fluxes. In: HARPER, L.A. et al. (ed). Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change. Madison: ASA, CSSA e SSSA, 1993. p.63-78. (ASA Spec. Publ. 55).

HYNES, R.K.; KNOWLES, R. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. Canadian Journal Microbiology, v. 28, p. 334-340, 1982.

IPCC (International Panel on Climate Change) Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. p. 546-554, 2006.

IPCC [INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE]. Climate change – The IPCC scientific assessment. Cambridge University, 572p., 1995.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. 2007. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Working Group II Report. *Chapter 5: Food, Fibre, and Forest Products*. Genebra, Suíça (2007). Disponível em: <http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-wg2.htm>. Acesso: 16-12-2010.

ISOLDI, L. A.; KOETZ, P. R. Tratamentos biológicos para remoção de matéria carbonada e nitrogenada. Revista eletrônica de Mestrado em Educação Ambiental, v. 12, p. 1517-1256, 2004.

JANZEN, H.H. et al. Management effects on soil C storage on the Canadian prairies. Soil & Tillage Research, v.47, p.181-195, 1998.

JARDIM-FREIRE, J.R.; COSTA, J.A.; STAMMEL, J.G. Principais fatores que propiciaram a expansão da soja no Brasil. Revista Plantio Direto, v.92, p.39-47, 2006.

JONES, C.M.; HALLIN. S. Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. The ISME Journal, v. 4, p.633-641, 2010.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal Systematic Bacteriology, v. 32, p. 136-139, 1982.

KESSAVALOU, A. et al. Greenhouse gas fluxes following tillage and wetting in a wheat-fallow cropping system. Journal of Environmental Quality, v.27, p.1105-1116, 1998.

KHALIL, M. et al. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O₂ concentration. Soil Biology and Biochemistry, v.36, p.687-699, 2004.

KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.;MOLINEUX, I.; AND KHORANA, H. G., Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. Journal Molecular Biology, v. 56, p. 341-361, 1971.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; INN Jr., W.C. Diagnóstico Microbiológico. 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 1465p, 2001.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, v.38, p.501-505, 1992.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, v.38, p.501-505, 1992.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA, Applied Environmental Microbiology, v. 60, p. 56-63, 1994.

LESSA, A. C. R.; PAREDES, D. S.; OLIVEIRA, W. R. D.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Produção de N₂O por estirpes de *Bradyrhizobium* sp. in vitro, e do solo sob plantas de soja noduladas. In: Congresso brasileiro de Ciência do Solo, 32, 2009, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009.

LEUNG, K.; YAP, K.; DASHTI, N.; BOTTOMLEY, P. J. Serological and ecological characteristics of a nodule-dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Applied Environmental Microbiology, v. 60, p. 408-415, 1994.

LINN, D.M.; DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and no-tilled soils. Soil Science Society of American Journal, v.48, p.1267-1272, 1984.

LUCINSKI, R., POLCYN, W., RATAJCZAK L., Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. Acta Biochimisty, v. 49, p. 537-546, 2002

MAHAN, B. M., MYERS, R. J. Química. Um curso universitário. Trad. de TOMA, H.E.; A R A K I K, D. O., MATSUMOTO, F. M. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1993.

MALORNY, B., HOOFFAR, J., HUGAS, M., HEUVELINK, A., FACH, P., ELLERBYOEK, L., BUNGE, C., DORN, C., HELMUTH, R. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. International Journal Food Microbiology, v. 83, p. 39-48, 2003

MATTHIAS, A.D. et al. A simple chamber technique for field measurement of emissions of nitrous oxide from soils. Journal of Environmental Quality, v.9, p.251-256, 1980.

MCCARTHY, J. J., CANZIANI, O.F., LEARY, N. A., DOKKEN, D. J., WHITE, K.S. Climate change 2001: impacts, adaptation, and vulnerability. United Nations Intergovernmental, 2001 Panel on Climate Change. Available at: www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg2/001.htm

MENDONÇA, L. C. Microbiologia e Cinética de Sistemas de Lodos Ativados como Pós-tratamento de Efluente de Reator Anaeróbico de Leito Expandido. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, departamento de Hidráulica e Saneamento, 240p., 2002.

- MESA, S., L. VELASCO, M.E. MANZANERA, M.J. DELGADO AND E.J. BEDMAR, Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*, *Microbiology*, V.148, P. 3553–3560, 2002.
- MINAMISAWA, K., Division of rhizobitoxine producing and hydrogen uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by nifDKE sequence divergence. *Plant and Cell Physiology*, v. 31, p 81-89, 1990.
- MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences na various other characteristics, *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, p. 2832-2839, 1992.
- MOSIER, A. R.; DUXBURY, J. M.; FRENEY, J. R.; HEINEMEYER O.; MINAMI, K. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: assessment, measurement and mitigation, *Plant Soil*, v. 181, p. 95–108, 1996.
- MOSIER, A. R.; KROEZE, C.; NEVISON, C.; OENEMA, O.; SEITZINGER S.; AND VAN CLEEMPUT, O. Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle, *Nutrient Cycling Agroecosystems*, v. 52, p. 225–248. 1998.
- MOSIER, A.; WASSMANN, R.; VERCHOT, L.; KING, J.; PALM, C. Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms. *Environment Development and Sustainability*, v. 6, p. 11–49, 2004.
- MULLIS, K., E FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, AND H. ERLICH., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, v. 51 p. 263-273, 1986.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. *Rizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans, *Journal Experimental Botany*, v.36, p.1179-1192, 1985.
- NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M., Efeito da reinoculação na soja (*Glycine max*) em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566,587,5019, 5079, 5080. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, p. 359-368, 1996.
- NORMAN, R. J.; EDBERG, J. C.; STUCKI, J.W., Determination of Nitrate in Soil Extracts by Dual-wavelength Ultraviolet Spectrophotometry, *Soil Science Society of America Journal*, v. 49, p.1182-1185, 1985.
- O'HARA, G. W., DANIEL. R. M. Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, v.17, p. 1-9, 1985.
- OKITO, A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. *Soil Biology e Biochemitry*, v. 36, p. 1179-1190, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S. e BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa Agrobiologia: Documentos, 161), 40 p, 2003.

OLIVEIRA, W. R. D., Quantificação das emissões de N₂O resultantes de fertilizante, fixação de N₂ e resíduos de colheita em argissolo vermelho amarelo, Dissertação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 47p., 2009.

PEOPLES M.B., HAUGGAARD-NIELSEN H, JENSEN E.S., The potential environmental benefits and risks derived from legumes in rotations. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) Agronomy Monograph. Nitrogen Fixation in Crop Production, American Society Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, USA, p. 349–385, 2009

PRINN, R.G., J. HUANG, R.F. WEISS, D.M. CUNNOLD, P.J. FRASER, P.G. SIMMONDS, A. MCCULLOCH, C. HARTH, S. REIMANN, P. SALAMEH, S. O'DOHERTY, R.H.J. WANG, L.W. PORTER, B.R. MILLER, AND P.B. KRUMMEL Evidence for variability of atmospheric hydroxyl radicals over the past quarter century, Geophysical Research Letters, 32p., 2005.

RELARE - Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, In: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 13., Londrina-PR. Anais... Londrina: Embrapa Soja, 212p, 2007.

ROBERTSON, G.P. et al. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. Science, v.289, p.1922-1925, 2000.

ROBERTSON, Dominique. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools, Annual Review of Plant Biology, vol. 55, p. 495-519, 2004.

ROBERTSON, G. AND P. GRACE, Greenhouse Gas Fluxes in Tropical and Temperate Agriculture: The need for a Full-Cost accounting of Global Warming Potentials, Environment Development and Sustainability, v. 6, p. 51-63, 2004.

ROCHESTER I.J., PEOPLES M.B., HULUGALLE N.R., GAULT R.R., Constable GA Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. Field Crops Research, v.70, p. 27–41, 2001.

ROCHETTE, P., AND JANZEN, H. H., Towards a revised coefficient for estimating N₂O emissions from legumes, Nutrient Cycling in Agroecosystems, v.73, p.171-179, 2005.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; BÉLANGER, G.; CHANTIGNY, M. H.; PRÉVOST, D.; LÉVESQUE G. Emissions of N₂O from alfalfa and soybean crops in Eastern Canada, Soil Science Society American Journal, v. 68, p. 493–506, 2004.

ROSENKRANZ, P., BRÜGGEMANN, N., PAPEN, H., XU, Z., SEUFERT, G., BUTTERBACH-BAHL, K., N₂O, NO and CH₄ exchange, and microbial N turnover over a Mediterranean pine forest soil, *Biogeosciences*, v. 3, p. 121-133, 2006.

RUMJANECK N. G.; DOBERT R. C.; VanBERKUN P.; AND TRIPLETT E. W., Common soybean strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium Elkanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 4371-4373, 1993.

RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; MORGADO, L.B. e NEVES, M.C.P. Feijão Caupi tem uma nova estirpe de Rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15), 16p, 2006.*

RUSER , R. et al. Compaction and fertilization effects on nitrous oxide and methane fluxes in potato fields. *Soil Science Society American Journal*, v.62, p.1587-1595, 1998.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, p. 6409-6412, 1990.

SAIKI, R., GELFAND, D., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G., MULLIS, K. AND ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, v. 239, p.487-91, 1988.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.,1989.

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; HIRAYAMA, J.; ITAKURA, M.; MITSUI, H.; EDA, S.; MINAMISAWA, K. Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the soybean root system via nitrous oxide reductase, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 2526–2532, 2006b.

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; MINAMISAWA, K. Correlation of denitrifying capability with the existence of nap, nir, nor e nos genes in diverse strains of soybean *Bradyrhizobia*. *Microbes and Environments*, v.21, p. 174-184, 2006a.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.SOUTO, S.M.; NEVES, M.C.P. e RUMJANECK, N.G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação de N₂ em amendoim (*Arachis hypogea L.*). *Acta Scientiarum, Agronomy*, v.27, p.301-307, 2005.

SANTOS, V. A. F.; NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Differential symbiotic efficiency by shading of soybean nodulated by *B. Japonicum* and *B. Elkanii* strains. *Soil Biology e Biochemistry*, v. 29, n. 5/6, p. 1015-1018, 1997.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em: http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp acesso em: 3 de março 2010.

SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F.J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. *World Journal Microbiol. Biotechnol.* p.12, v. 163-174, 1996

SHAPLEIGH, J. P., The denitrifying prokaryotes, p. 769-792. In M. Dworkin (ed.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, Springer-Verlag, 2007.

SITAUOLA, B.K. et al. Rapid analysis of climate gases by wide bore capillary gas chromatography. *Journal of Environmental Quality*, v.21, p.493-496, 1992.

SMITH, G. B., SMITH, M. S., Symbiotic and free-living denitrification by *Bradyrhizobium japonicum*, *Soil Science Society American*, v. 50, p. 349–354, 1986.

SMITH, J. L. & MYUNG, H. U. Rapid procedures for preparing soil and KCL extracts for ¹⁵N analysis, *Community Soil Science and Plant Analyses*, v. 21, p. 2173-2179, 1990.

SPRENT, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective, *Soil Biology Biochemist*, v. 27, p. 401–407, 1995.

TAYLOR, C. et al., Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor, *The Biochemical Journal*, v. 291, p. 493–504, 1993.

THOMSEN, J.; GEEST, T.; and COX, R. Mass-spectrometric Studies of the Effect of pH on the Accumulation of Intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 536-541, 1994.

TIEDJE, J.M., *Methods of Soil Analysis, Denitrifiers, Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of American, Part 2, p. 245-267, 1994.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. *Journal Bacteriology*, v. 177, p. 468-472, 1995.

VAN BERKUM P, KEYSER H.H., Anaerobic growth and denitrification among different serogroups of soybean rhizobia, *Applied Environmental Microbiology*, v. 49, p. 772–777, 1985.

VAN BERKUN, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3835-3841, 1990.

VAN SPANNING, R.; RICHARDSON, D., FERGUSON, S. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: Bothe, H., *et al.* (Eds.) *Biology of the nitrogen cycle*. p. 3-20. Amsterdam: Elsevier. 2007.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. Duas novas esitirpes para inoculação da soja. Planaltina, EMBRAPA-CPAC, (EMBRAPA CPAC. Comunicado técnico), 3p, 1992.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; PERES, J. R. R. Fixação biológica de nitrogênio em solos do cerrado. Brasília: EMBRAPA-SPI, 83p, 1994.

VELASCO, L., S. MESA, C. X. U., M. J. DELGADO AND E. J. BEDMAR, Molecular characterization of nosRZDFYLX genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 85, p. 229–235, 2004

WATSON, R.J., HAITAS-CROCKETT, C., MARTIN, T., HEYS, R. Detection of *Rhizobium meliloti* cells in field soil and nodules by polymerase chain reaction, *Canadian Journal Microbiology*, v. 41, p. 815-825, 1995.

WEBER, D. F.; KEYSER, H. H.; URATSU, S. L. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas, *Agronomical Journal*, v.81, p. 786-789, 1989.

XAVIER, G. R. Estudo da ocupação nodular de rizóbio em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) agrupados pela técnica de RAPD. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 123 p, 2000.

YANG, L., CAI, Z. The effect of growing soybean (*Glycine max* L.) on N₂O emission from soil, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, p. 1205-1209, 2005.

YE, R. W.; THOMAS S. M. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications, *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 307–312, 2001.

ZUMFT, W. G., Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal Inorganic Biochemistry*, v. 99, p.194-215, 2005.

ZUMFT, W. G., Cell biology and molecular basis of denitrification, *Microbiology Molecular Biology*, v. 61, p. 533-616, 1997.