



## Emissão de óxido nítrico em solo de cana-de-açúcar sob aporte de resíduo vegetal<sup>(1)</sup>.

**Felipe José Cury Fracetto<sup>(2)</sup>, Giselle Gomes Monteiro Fracetto<sup>(3)</sup>, Brigitte Josefine Feigl<sup>(4)</sup>.**

<sup>(1)</sup>Trabalho executado com recurso do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq. <sup>(2)</sup>Pós-doutorando, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE; curyfelipe@hotmail.com. <sup>(3)</sup>Professor, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE; <sup>(4)</sup>Professor, Universidade de São Paulo-USP, Piracicaba-SP.

**RESUMO:** O Brasil tem liderado a produção e exportação mundial de cana-de-açúcar elevando-se a produtividade e a quantidade de insumos agrícolas aplicados ao solo, favorecendo emissões de gases de aquecimento global. O objetivo deste trabalho foi calcular as emissões de óxido nítrico (N<sub>2</sub>O) em solos cana-de-açúcar incubados, adubados e cobertos por resíduo vegetal da própria cultura (palha) e avaliar a quantidade de genes de bactérias desnitrificantes (óxido nítrico redutase-*norB*) presente nestes solos, diretamente envolvidos na produção deste gás por desnitrificação biológica. As amostras de solo foram incubadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e a umidade foi corrigida para 70% da capacidade de campo. Metade de uma parcela das amostras foi coberta com palha, contendo ainda fertilizantes nitrogenados. As amostras foram coletadas e analisadas por trinta dias de incubação e o fluxo de N-N<sub>2</sub>O foi obtido por cromatografia gasosa. Já os genes *norB* foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os maiores fluxos de N-N<sub>2</sub>O foram encontrados nos solos fertilizados e encobertos por palha. Emitiu-se quase o dobro de N-N<sub>2</sub>O nos solos encobertos pela palha (0,45 mg.m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>), em relação aos solos ausente da cobertura (0,8 mg.m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). A quantidade de genes *norB* foi de 1,3.10<sup>6</sup> no tratamento com palha, sendo 76 vezes superior ao encontrado no solo sem a palha, no 1<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de incubação. O gene *norB* foi responsável pela produção de N<sub>2</sub>O, por desnitrificação biológica, em solos encobertos pela palha e essa emissão foi intensificada pela ação dos fertilizantes nitrogenados aplicados.

**Termos de indexação:** qPCR; desnitrificação biológica; gene *norB*.

### INTRODUÇÃO

O efeito estufa é um fenômeno natural e imprescindível para a manutenção da vida no planeta. Contudo, o desenvolvimento econômico e industrial tem elevado a concentração dos gases causadores do efeito estufa (GEE) na atmosfera. Entre estes, faz-se destaque ao N<sub>2</sub>O, um gás com potencial de aquecimento global 310 vezes superior

ao CO<sub>2</sub> (IPCC, 2010), cuja principal fonte no Brasil é o setor agropecuário.

Com o avanço da biotecnologia e das atuais técnicas de manipulação do DNA, tornou-se possível descrever alguns fatores relacionados às emissões de N<sub>2</sub>O. Segundo Canfield et al., (2011) o gene *norB* é o mais diretamente ligado a produção deste gás. Este gene funcional é encontrado em espécies de bactérias no solo e sabe-se que o elevado teor de umidade favorece reações de desnitrificação nos solos.

Após a fixação do N<sub>2</sub> e conversão da amônia a nitrato, pela via da nitrificação, ocorre o processo de desnitrificação, que consiste na redução do nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>). Esta reação está associada com a liberação de óxido nítrico (NO) e de N<sub>2</sub>O (Stern, 2006).

Em relação à funcionalidade de populações microbianas, a utilização da qPCR permite quantificar genes funcionais como os envolvidos na desnitrificação biológica. Com isso, o avanço de determinadas técnicas moleculares permitiu ampliar o estudo da ciclagem de nutrientes e energia nos solos.

Para solos de cana-de-açúcar, a cobertura vegetal, que é composta pelo próprio resíduo da cultura (palha), retém a umidade no solo por mais tempo, permitindo a formação de microssítios de anaerobiose onde atuam os genes da desnitrificação, por utilizarem o nitrato como receptor de elétrons em suas reações redox (Wrage et al., 2004).

Supõe-se então, que nestas condições de elevada umidade e aporte de insumos nitrogenados no solo seja encontrado maior número de genes *norB* e, ao mesmo tempo, observados os maiores fluxos de N-N<sub>2</sub>O. Assim, o objetivo deste trabalho foi calcular o fluxo de N-N<sub>2</sub>O e a quantidade de genes *norB* em solos de cana-de-açúcar, incubados em laboratório, sob a presença de insumos nitrogenados e cobertura vegetal.

### MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras de solo de cana-de-açúcar foram realizadas em uma fazenda pertencente a uma usina de açúcar e álcool, no município de



Piracicaba-SP. A amostragem foi realizada no laboratório de Biogeoquímica ambiental-CENA/USP e Microbiologia Molecular-ESALQ/USP.

Os tratamentos avaliados foram: i) Testemunha (sem a aplicação de fertilizante nitrogenado); ii) Nitrato de amônio ( $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de N) e iii) Ureia ( $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de N), tanto para solos cobertos pelo resíduo da cultura (com palha), quanto para solos sem essa cobertura (sem palha).

No laboratório, os solos foram homogeneizados e peneirados a 2 mm. A umidade do solo foi corrigida para 70 % da capacidade de campo. Em seguida, os solos foram colocados em frascos de vidro de  $1,5 \text{ dm}^{-3}$ . Durante todo o período de estabilização e amostragem dos gases, os frascos com 300 gramas dos solos avaliados foram fechados e mantidos dentro do laboratório a uma temperatura entre 24,5 e 26°C.

Nos tratamentos com palha, os resíduos culturais coletados no campo de cultivo de cana-de-açúcar foram lavados em água corrente e secos totalmente a 40 °C. Em seguida foram cortados em pedaços de 2 a 3 cm, para posteriormente serem utilizados nos frascos de incubação. Após estes procedimentos, pode-se garantir que a palha utilizada nos frascos estava seca para não interferir nas emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  via ação microbiana endofítica.

Após 24 horas de estabilização, os frascos foram ventilados manualmente e, finalmente fechados para a realização da primeira amostragem. Para coleta das amostras, os frascos permaneceram incubados por 30 minutos e, todo este procedimento de coleta do gás e observação do valor da umidade foi realizado por 30 dias. As amostras coletadas foram armazenadas em seringas do tipo BD (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda) de nylon de 20 e analisadas no equipamento Shimadzu® GC-mini.

No total, foram utilizados os 6 tratamentos com 5 repetições de laboratório e, paralelo a estes 30 frascos com solos incubados, usou-se mais 3 frascos sob as mesmas condições, que serviram para coletar o solo para análise molecular do gene *norB*, exatamente no mesmo dia em que se obtivesse os maiores valores na emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$ , de forma a não desestruturar os solos dos demais frascos durante os 30 dias de análises.

Para análise do gene *norB*, o solo coletado dos frascos paralelos aos da coleta de gases teve seu DNA extraído utilizando o Kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio Laboratories, EUA). Em seguida as análises de qPCR foram iniciadas e os *primers* utilizados e as condições de amplificação segundo Dandie et al., (2007) estão descritos na **Tabela 1**. As reações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) utilizando o sistema SYBR GreenI.

Para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos, os dados foram submetidos à análise

de variância (ANOVA), através do software Sisvar e as médias comparadas com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As emissões diárias de  $\text{N-N}_2\text{O}$  dos tratamentos com e sem palha sob condições controladas (incubação em laboratório) estão representadas na **Figura 1**.

As emissões diárias de  $\text{N-N}_2\text{O}$  nos tratamentos sem a aplicação de fertilizante nitrogenado (testemunha) foram de  $0,05 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  nos 30 dias de incubação na condição de manejo com a palha. Portanto, são significativamente menores quando comparadas aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Até o 8º dia não foi possível observar alterações nos fluxos de emissões para nenhum tratamento.

As máximas emissões de  $\text{N-N}_2\text{O}$  ocorreram próximas ao 14º dia após a aplicação dos fertilizantes nitrogenados e sob a condição da manutenção da palha no solo, apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores obtidos, sendo de  $0,45 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  nos solos sem a palha e  $0,8 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  em solos com a palha. Estes valores estabilizaram-se após o 18º dia chegando ao 30º dia com valores próximos a zero.

Ciarlo et al. (2008) mostraram que as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  são mais elevadas no solo quando se usa o nitrato de amônio, o que favorece as emissões por desnitrificação. Zhang et al., (2009) mostraram que a adição de nitrato de amônio no solo favorece emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  quando associadas ao fator umidade, desde que os poros no solo estejam com mais de 70% da capacidade de retenção de água. Contudo, o presente trabalho mostrou que as emissões de  $\text{N-N}_2\text{O}$  nos tratamentos com a aplicação de ureia e nitrato de amônio não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre eles.

A redução biológica do nitrato pode ocorrer durante a desnitrificação, mas pode ocorrer emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  por nitrificação (BOUWMAN, 1998). No presente trabalho, o gene responsável pelas emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  foram quantificados e comparados quanto aos tratamentos avaliados, porém cabe ressaltar que se trata de um gene encontrado em bactérias que realizam desnitrificação biológica e não a nitrificação. No entanto, atribui-se os valores desta emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  por desnitrificação, visto que estes solos continham 70% dos poros preenchidos por água e o insumo nitrogenado foi o nitrato de amônio.

O gene *norB* ocorre em cepas de bactérias desnitrificantes (Canfield, et al., 2011). A atividade deste gene, proveniente da redução do nitrato, resulta na formação do óxido nitroso. A quantificação do gene *norB* encontra-se na **Figura**



2. Este gene apresentou um número de cópias de  $1,3 \cdot 10^6$  no tratamento com palha, cerca de 76 vezes superior ao encontrado nos solos sem a palha, obtendo assim diferença estatística entre os manejos avaliados ( $p < 0,05$ ) no 1º e 30º dia de incubação. Já entre os tratamentos, não foi possível observar diferenças significativas em todas as datas avaliadas.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que a presença da palha garantiu a umidade no solo, condicionando a formação de microssítios de anaerobiose, onde atuaram os genes *norB*, em quantidade superiores ao tratamento sem a palha. Estes micro-organismos presentes no solo passaram a utilizar o nitrato disponível como aceptor final de elétrons em suas reações redox, proporcionando a formação e liberação de  $N_2O$  para a atmosfera.

### CONCLUSÃO

O gene *norB* foi responsável pela produção de  $N_2O$ , por desnitrificação biológica, em solos encobertos pela palha e esta emissão foi intensificada pela ação dos fertilizantes nitrogenados aplicados.

### AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela concessão de bolsa durante o desenvolvimento do trabalho e às equipes dos laboratórios de Microbiologia Molecular-ESALQ/USP e Biogeoquímica Ambiental-CENA/USP por ceder toda infra-estrutura para realização deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

BOUWMAN, A.F.; BOUWMAN, L.J.M.; BATJES, N.H. Modeling global annual and  $N_2O$  emissions from fertilized fields. *Global Biogeochemical Cycles*, 16:1080–1088, 1998.

CANFIELD, D.E.; GLAZER, A.N.; FALKOWSKI, P.G. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330:192-196, 2011.

CIARLO et al. Soil  $N_2O$  emissions and  $N_2O / (N_2O + N_2)$  ratio as affected by different fertilization practices and soil moisture. *Biology and Fertility of Soils*, 44:991-995, 2008.

DANDIE et al. Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology*, 30:128-138, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE-IPCC. Technical summary on Climate change. Cambridge, 2010. 398p.

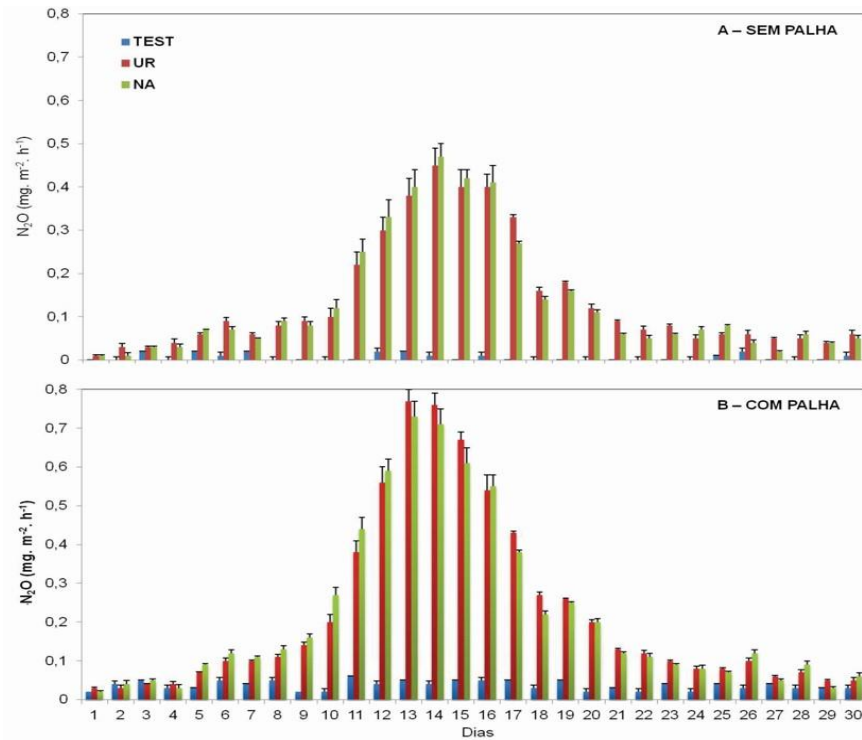
STERN, N. Review on the Economics of Climate Change. Paper A: The Case for action to reduce the risks of Climate Change. Cambridge, 2006. p.224-234.

WRAGE et al. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of denitrification. *Soil Biology & Biochemistry*, 36:229–236, 2004.

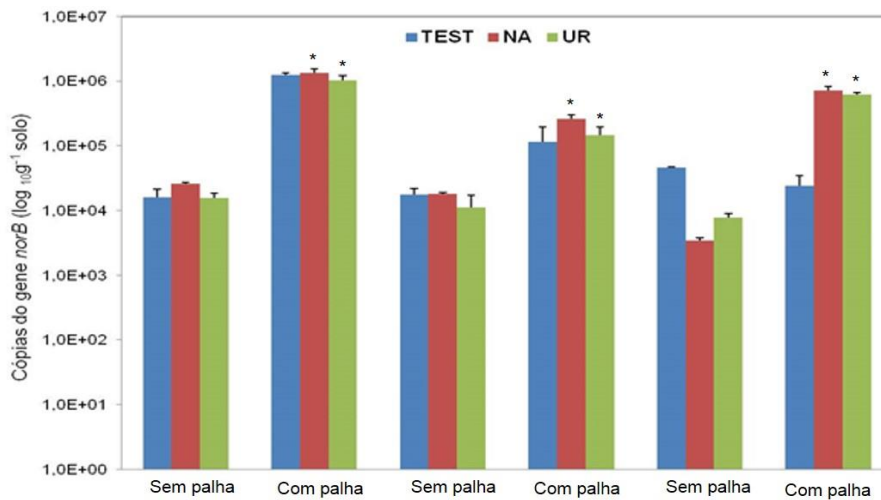
ZHANG et al. Minimization of  $N_2O$  emissions from a plant-soil system under landfill leachate irrigation. *Waste Management*, 29:1012-1017, 2009.

**Tabela 1**– Gene *norB* alvo do presente estudo, quantificados por meio de PCR quantitativo em tempo real

Gene alvo	Primers	Sequência (5'-3')	Perfil térmico
<i>norB</i>	cnorBbF	AIGTGGTCGAGAAGTGGCTCTA	95°C/ 15 min, 40 ciclos (95°C/ 15 seg, 68-62°C (-1°C por ciclo)/ 60 seg, 81,5°C/ 30 seg).
	cnorBbR	TCTGIACGGTGAAGATCACC	



**Figura 1** – Emissões diárias de N-N<sub>2</sub>O em solos de cana-de-açúcar sob condições controladas (incubação). A-Simulação de solos sem a palha. B-Simulação de solos com a palha. TEST-Testemunha (sem a aplicação de fertilizante); UR – Solos com aplicação de Ureia e NA – Solos com aplicação de Nitrato de amônio.



**Figura 2** - Quantificação do gene *norB* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições controladas (incubação no laboratório). Tratamentos avaliados: com e sem a manutenção da palha. TEST-Testemunha (sem fertilizante); UR-Solos com aplicação de Ureia e NA-Solos com aplicação de Nitrato de amônio. \* Indica diferença significativa entre os manejos com e sem palha para os tratamentos UR e NA (p<0,05).