**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Emissão de óxido nitroso (N₂O) e abundância da comunidade
de bactérias desnitrificantes no agrossistema cana-de-açúcar**

Felipe José Cury Fracetto

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Ciências. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2013**

Felipe José Cury Fracetto
Licenciado em Ciências Biológicas

**Emissão de óxido nitroso (N₂O) e abundância da comunidade de
bactérias desnitrificantes no agrossistema cana-de-açúcar**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **BRIGITTE JOSEFINE FEIGL**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Fracetto, Felipe José Cury

Emissão de óxido nitroso (N₂O) e abundância da comunidade de bactérias desnitrificantes no agrossistema cana-de-açúcar / Felipe José Cury Fracetto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

88 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cana-de-açúcar 2. Óxido nitroso 3. Bactérias desnitrificantes 4. PCR em tempo real I. Título

CDD 633.61
F799e

Dedico e ofereço

Aos mesmos a quem dedico minha VIDA:

Jenice Rejane Cury Fracetto (mãe) & Osmair José Fracetto (pai), Josiane Rafaela Cury Fracetto (irmã) & Giuseppe La Porta (cunhado) pelos momentos maravilhosos juntos, pelo carinho e amor eterno e por permitirem a total liberdade nas minhas escolhas e na realização dos meus objetivos.

À minha amada esposa Giselle Gomes Monteiro Fracetto, pelo amor e companheirismo intenso, por toda a orientação, compreensão e pelo conhecimento que obtive durante a realização prática e teórica de toda a Biologia Molecular contida neste trabalho.

“Como é bom ter ao meu lado uma pessoa tão iluminada como você, Giselle G.M F.”.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Brigitte Josefine Feigl (Eterna Admiração) e ao coordenador do projeto Carlos Clemente Cerri, por todo apoio, paciência e dedicação para comigo durante os 4 anos de desenvolvimento desta Tese e pelos 11 anos de convivência profissional.

Ao Profº. Dr. Fernando Andreote pela orientação, pelas ideias e demais colaborações que contribuíram com a construção deste projeto.

Ao Dr. Marcos Siqueira Neto pelas ideias decisivas contidas neste projeto, auxílio nos cálculos e estatísticas, pelas publicações e pelo companheirismo. (“Publicações que não param por aí”).

Ao Profº. Dr. Carlos Eduardo Cerri (Ado) pela dedicação em todos os trabalhos (mestrado e doutorado) e por permitir duas de minhas publicações internacionais. (Eterno agradecimento).

Aos funcionários da Usina Raizen, Erdilei Caetano Barbosa e Diego Marsão por facilitar o acesso às áreas de cana e as instalações dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Márcio Lambais pelo apoio, reconhecimento e admiração, além de permitir a realização da parte molecular deste projeto em seu laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Lilian Campos, Sandra Nicoletti, Dagmar Marquesoni, Ralf Araujo, Admilson, Jose Souto (Zezinho) e Thaís pela colaboração nas análises químicas do solo e pela amizade.

Aos companheiros de trabalho: Leidivan Frazão, João Carvalho, José Geraldo, Naissa Dias, Felipe Raquena, Bruna Gonçalves, Caio & Arlete, pelo companheirismo.

Ao Profº. Antonio Bianch pela amizade.

Ao amigo Profº. Roberto Telles, pelos conselhos humanos, didáticos, amizade sincera e total generosidade.

Aos meus amigos do Depto de Microbiologia Agrícola.

Aos meus avós pela convivência prazerosa e por tudo o que fazem para mim.

À coordenação e secretaria do departamento de Microbiologia Agrícola pelo apoio geral.

Aos amigos verdadeiros, com os quais eu convivo e mantenho contato, sem a necessidade de citar nomes em função do autoconhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 Revisão Bibliográfica	21
2.1.1 Cana de açúcar no Brasil	21
2.1.2 Micro-organismos e emissões de GEE	22
2.1.3 Ciclo do nitrogênio e emissão de N ₂ O.....	23
2.1.4 Microbiologia molecular e emissões de N ₂ O	25
2.1.5 PCR quantitativo em tempo real.....	27
2.2 Material e Métodos	28
2.2.1 Incubação de amostras de solo em condições controladas (incubações em laboratório)	29
2.2.1.1 Análises químicas do solo e da palha	29
2.2.1.2 Metodologia de incubação dos solos e análises de N-N ₂ O	30
2.2.1.3 C e N da biomassa microbiana do solo	32
2.2.1.4 Análises moleculares.....	33
2.2.1.4.1 Extração do DNA total do solo de cana-de-açúcar.....	33
2.2.1.4.2 PCR quantitativo em tempo real.....	34
2.2.2 Análises do solo de cana-de-açúcar em condições naturais (no campo de cultivo)	35
2.2.2.1 Caracterização da área e tratamentos avaliados	35
2.2.2.2 Análises químicas do solo e da palha	36
2.2.2.3 Análises de N-N ₂ O no campo de cultivo.....	36
2.2.2.4 C e N da biomassa microbiana e N-inorgânico no solo.....	38
2.2.2.5 Análises moleculares.....	39
2.2.2.5.1 Extração do DNA total das amostras de solo e da palha de cana-de-açúcar	40
2.2.2.5.2 PCR quantitativo em tempo real.....	40
2.2.2.5.3 Influência da queima da palha de cana-de-açúcar na desnitrificação	41

2.3 Resultados e Discussão	43
2.3.1 Experimentos em condições controladas (incubações em laboratório).....	43
2.3.1.1 Emissão de N-N ₂ O	43
2.3.1.2 Estimativas do C e N da biomassa microbiana do solo.....	48
2.3.1.3 Quantificação dos genes envolvidos na desnitrificação	51
2.3.2 Solos de cana-de-açúcar em condições naturais (no campo de cultivo).....	56
2.3.2.1 Emissão de N-N ₂ O	56
2.3.2.2 Comparação das estimativas das emissões de N-N ₂ O sob as condições de laboratório e de campo.....	63
2.3.2.3 C e N da biomassa microbiana e N-inorgânico no solo.....	63
2.3.2.4 Quantificação dos genes envolvidos na desnitrificação	67
2.3.2.5 Influência da queima da palha de cana-de-açúcar na desnitrificação	75
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Emissão de óxido nitroso (N₂O) e abundância da comunidade de bactérias desnitrificantes no agrossistema cana-de-açúcar

Nos últimos anos, o Brasil tem liderado a produção e exportação mundial de cana-de-açúcar e seus derivados. Com isso, a produtividade agrícola aumenta necessitando-se ampliar as pesquisas de caráter sócio-ambiental, a fim de modelar um desenvolvimento tecnológico mais próximo do sustentável. Desta forma, torna-se necessário conhecer a contribuição do plantio da cana-de-açúcar com o aumento da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera, especialmente no que se refere ao óxido nitroso (N₂O), derivado do uso de fertilizantes nitrogenados. Sabe-se que na ausência de oxigênio, bactérias específicas passam a reduzir compostos nitrogenados, formando este poderoso gás de aquecimento global durante as etapas decorrentes de um processo conhecido como desnitrificação biológica. Através dos avanços nas áreas da biologia molecular, tornou-se possível conhecer os micro-organismos não cultiváveis e suas respectivas funções em um determinado ambiente. Este trabalho teve como objetivo estimar as emissões de N-N₂O nos solos de cana-de-açúcar derivadas da aplicação de fertilizantes nitrogenados durante um período de trinta dias, em duas situações de manejo da cultura: I- Sem queima: colheita mecanizada com a manutenção da palha da cana; II-Com queima: colheita manual precedida pela queima da palha da cana. Simultaneamente, os genes envolvidos na desnitrificação e produção de N₂O no solo (*norB*, *nirK*, *nirS* e *nosZ*) foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real em condições de laboratório e de campo. Sob condições de laboratório, pode-se observar que as emissões de N-N₂O atingiram 0,8 mg.m⁻² h⁻¹ em solos com a manutenção da palha, tanto com a aplicação de uréia quanto de nitrato de amônio. Os mesmos produtos, quando aplicados em solos sem a presença da palha emitiram 0,45 mg.m⁻² h⁻¹. No campo, os maiores fluxos de N-N₂O foram encontrados no período de elevada precipitação pluviométrica, que ocorreu na primeira semana após a aplicação do fertilizante nitrato de amônio, chegando a 0,7 mg.m⁻² h⁻¹ nos solos com palha e 0,37 mg.m⁻² h⁻¹ nos solos sem a palha. Tanto no campo quanto no laboratório foram encontradas as maiores quantidades dos genes envolvidos na desnitrificação em solos com a permanência da palha, com valores próximos de 10⁷ genes por grama de solo. A atual tendência a substituir a colheita manual da cana pela colheita mecanizada favorece a agregação do solo, diminui o grau de erosão e aumenta os estoques de carbono, mas também pode resultar em aumento das emissões de N-N₂O e do fator de emissão dos fertilizantes nitrogenados, conforme encontrado para o nitrato de amônio aplicado no campo, onde o valor obtido foi de 0,3% para os solos sem a palha e 0,7% para solos com palha. Sendo assim, é fundamental estudar as melhores condições do uso da terra e o papel exercido pela microbiota que nela existe, proporcionando um tratamento mais adequado aos resíduos culturais, diminuindo assim as emissões de gases estufas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Óxido nitroso; Bactérias desnitrificantes; PCR em tempo real

ABSTRACT

N₂O emissions and bacteria denitrifying community abundance in sugarcane agrosystem

In recent years, Brazil has led the production and worldwide export of sugarcane and its products. Thus, agricultural productivity increases need to expand research of socio-environmental, in order to model a technology development closer sustainable. Therefore, it is necessary to know the contribution of planting sugarcane with increasing concentration of greenhouse gases in the atmosphere, especially with regard to nitrous oxide (N₂O), derived from nitrogenous fertilizer use. It is known that in the absence of oxygen, bacteria are specific to reduce nitrogen, forming this powerful global warming gas arising during the stages of a biological process known as denitrification. Through advances in molecular biology, it has become possible to know the non-cultivable micro-organisms and their functions in a given environment. This study aimed to measure the emissions of N-N₂O in soils of sugarcane derived from the application of nitrogen fertilizers for a period of thirty days, in two situations crop management: I-No burning: mechanized harvesting with maintaining cane straw; II-With burning: manual harvest preceded by burning the straw. Simultaneously, the genes involved in denitrification and N₂O production in soil (*norB*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ*) were quantified by real-time quantitative PCR in the laboratory and the field. Under laboratory conditions, it can be seen that the N-N₂O reached 0,8 mg.m⁻² h⁻¹ in soils with maintaining the straw, either with the application of urea and ammonium nitrate. The same products, when applied to soils without the presence of straw delivered 0,45 mg.m⁻² h⁻¹. In the field, the highest N-N₂O fluxes were found in the period of high rainfall, which occurred in the first week after application of ammonium nitrate, reaching 0,7 mg.m⁻² h⁻¹ in soils with straw and 0,37 mg.m⁻² h⁻¹ in the soil without straw. Both in the field and in the laboratory were found greater amounts of genes involved in denitrification in soils fertilized with the permanence and straw, with values close to 10⁷ per gram of soil. The current trend is to replace manual harvesting of sugarcane by mechanized harvesting promotes soil aggregation, decreases the degree of erosion and increases carbon stocks, but can also result in increased emission factor of nitrogen fertilizers, as found for nitrate applied in the field, where the value was 0,3% for the soil without straw and 0.7% for soils with straw. Therefore, it is essential to study the best conditions of land use and the role played by the microbiota that is therein, providing appropriate treatment to crop residues, thus reducing greenhouse gas emissions.

Keywords: Sugarcane; Nitrous Oxide; Denitrifying bacteria; Real-time PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral do ciclo do nitrogênio	25
Figura 2 – As principais vias de transformação biológica do nitrogênio. Genes que codificam enzimas que conduzem as transformações importantes incluem as nitrito redutase (<i>nirS</i> e <i>nirK</i>), óxido nítrico redutase (<i>norb</i>), óxido nitroso redutase (<i>nosZ</i>). Adaptado (Canfield, et al., 2011)	27
Figura 3 – Incubação de solos de cana-de-açúcar. A – Esquema dos frascos de incubação de solos de cana-de-açúcar com as seringas utilizadas na coleta de N ₂ O. B – Analisador de gás: Cromatógrafo Shimadzu® GC-mini	32
Figura 4 – Câmaras para coleta de N ₂ O. A – Câmara e seringas utilizadas na coleta do gás. B – Câmara no tratamento com palha. C – Câmara com palha artificial. D – Câmara no tratamento sem palha	37
Figura 5 – Solos de cana-de-açúcar sem aplicação de fertilizantes nitrogenados. A – Solos com palha: colheita mecanizada sem a queima do cultivo. B – Solos sem queima e ao mesmo tempo com a palha retirada da linha do cultivo. C – Solos sem palha: colheita manual precedida pela queima da palha .	42
Figura 6 – Emissões diárias de N-N ₂ O em solos de cana-de-açúcar sob condições controladas. A – Simulação de solos sem a palha. B – Simulação de solos com a palha. TEST – Testemunha; UR – Ureia e NA – Nitrato de amônio	44
Figura 7 – Emissões acumuladas de N-N ₂ O em solos de cana-de-açúcar sob condições controladas. A – Simulação de solos sem a palha. B – Simulação de solos com a palha. TEST – Testemunha; UR – Ureia e NA – Nitrato de amônio	45
Figura 8 – Biomassa microbiana do solo (BMS) na camada 0-10 cm nos 3 períodos avaliados durante a incubação do solo. A – C-microbiano. B – N-microbiano. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizantes); NA – Solo com aplicação nitrato de amônio; UR – Solo com aplicação de ureia	49
Figura 9 – Quantificação dos genes 16S rDNA bacteriano em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados:	

- com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR)51
- Figura 10 – Quantificação dos genes *nirS* e *nirK* envolvidos na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados: com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR) .53
- Figura 11 – Quantificação dos genes *norB* e *nosZ* envolvidos na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados: com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR) .54
- Figura 12 – Emissões diárias de N-N₂O em solos de cana-de-açúcar sob condições de campo. A – Solos sem aplicação de nitrato de amônio. B – Solos com aplicação de nitrato de amônio. Em B estão representados os valores de precipitação pluviométrica58
- Figura 13 – Emissões acumuladas de N-N₂O em solos de cana-de-açúcar sob condições de campo. A – Solos sem aplicação de nitrato de amônio. B – Solos com aplicação de nitrato de amônio60
- Figura 14 – Biomassa microbiana do solo (BMS) na camada 0-10 cm nos 5 períodos avaliados. A – C-microbiano; B – N-microbiano. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizante); NA – Nitrato de amônio utilizado como fertilizante65
- Figura 15 – N-inorgânico nos solos de cana-de-açúcar na camada 0-10 cm nos 5 períodos avaliados. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizante); NA – Nitrato de amônio utilizado como fertilizante66
- Figura 16 – Quantificação do gene 16S rDNA em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Aplicação de nitrato de amônio68
- Figura 17 – Quantificação do gene *nirS* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio69
- Figura 18 – Quantificação do gene *nirK* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados:

sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio70

Figura 19 – Quantificação do gene *norB* envolvido na desnitrificação biológica para solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio71

Figura 20 – Quantificação do gene *nosZ* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio73

Figura 21 – Solos de cana-de-açúcar ausentes de fertilizantes nitrogenados sob três condições de manejo avaliadas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises químicas dos solos de diferentes manejos de cultivo de cana-de-açúcar na camada 0-10 cm	29
Tabela 2 – Análise bioquímica dos componentes da palha, adicionadas aos solos com cana-de-açúcar	29
Tabela 3 – Genes alvo do presente estudo, quantificados por meio de PCR quantitativo em tempo real	35
Tabela 4 – Equação que descreve as emissões acumuladas de N-N ₂ O para os tratamentos e condições de manejo avaliadas em campo (p<0,05)	46
Tabela 5 – Emissões médias de N-N ₂ O e erro padrão (n=5) para os tratamentos testemunha e nitrato de amônio sob as condições avaliadas no laboratório	47
Tabela 6 – Equação que descreve as emissões acumuladas de N-N ₂ O para os tratamentos e condições de manejo avaliadas em campo (p<0,05)	61
Tabela 7 – Emissões médias de N-N ₂ O e erro (n=5) para os tratamentos testemunha e nitrato de amônio sob as condições avaliadas no campo	62

1 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 exponencialmente a concentração dos gases causadores do efeito estufa (GEE) na atmosfera. Entre estes, faz-se destaque ao óxido nitroso (N_2O), um gás com potencial de aquecimento global 310 vezes maior que o CO_2 , cuja principal fonte no Brasil é o setor agropecuário.

O Brasil, um dos maiores produtores de cana-de-açúcar, tem investido em pesquisas de caráter socioambiental para tentar controlar as emissões de N_2O , baseando-se principalmente no tratamento adequado do solo, no tipo e quantidade de fertilizantes empregados na cultura.

Com o avanço da biotecnologia e das atuais técnicas de manipulação do DNA, tornou-se possível descrever alguns fatores diretamente relacionados às emissões de N_2O . Nesta perspectiva, destaca-se a participação de micro-organismos, mais especificamente bactérias, que na ausência de oxigênio, podem realizar a desnitrificação biológica, que ocorre devido à redução de compostos inorgânicos, como o nitrato, tendo o óxido nitroso e o nitrogênio molecular como produtos finais.

O desenvolvimento científico genético-molecular proporcionou conhecer e até mesmo quantificar alguns genes microbianos envolvidos nas etapas da desnitrificação, destacando os nitrito redutases (*nir*), o óxido nitroso redutase (*nos*) e, o mais diretamente ligado a produção de N_2O , o óxido nítrico redutase (*nor*). Estes genes de caráter funcional são encontrados em espécies de bactérias presentes no solo e, ainda não se conhece os principais efeitos que os sistemas de manejo dos solos brasileiros aliados à aplicação de insumos nitrogenados podem causar no desenvolvimento destes micro-organismos.

Considerando o agrossistema cana-de-açúcar e as atuais técnicas de manejo dos solos brasileiros, necessita-se avaliar as emissões de N_2O , no intuito de colaborar com as demais pesquisas agrárias, buscando garantir uma produtividade agrícola com mínimos impactos negativos ao clima e à biosfera.

Pressupõe-se que a mudança de manejo da cultura de cana-de-açúcar de colheita manual para colheita mecanizada, sob a ação de insumos nitrogenados,

afete as taxas de emissão de N_2O e, ao mesmo tempo, a quantidade de genes relacionados a esta emissão.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi medir as taxas de emissão de N_2O , quantificando os principais genes responsáveis pela desnitrificação, em solos de cana-de-açúcar com e sem a manutenção da palha e na presença de fertilizantes nitrogenados, tanto em condições controladas (incubações de amostras de solo em laboratório) como em condições naturais de campo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Cana de açúcar no Brasil

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por aproximadamente 35 % da produção mundial (IBGE, 2012). O cultivo da cana-de-açúcar ocupa no Brasil aproximadamente 7 milhões de hectares, com uma produção anual de 588 milhões de toneladas na safra 2012/2013, sendo 87 % desse total no centro-sul do país (UNICA, 2013). Este setor deverá ultrapassar 12 milhões de hectares na safra de 2015/16 (TORQUATO, 2006).

Parte da cultura de cana-de-açúcar ainda sofre a prática da queima da palha para facilitar e baratear a colheita manual. A queima pode provocar periodicamente interferências nos ecossistemas, tanto dentro como junto às lavouras canavieiras, além de gerar intensa poluição atmosférica, a qual é prejudicial à saúde e afeta não apenas as áreas rurais adjacentes, mas também os centros urbanos mais próximos (SZMRECSÁNYI, 1994). Em razão da poluição, na forma de gases (fumaça) e fuligem, causada pela queima, o interesse em evitar a queima do canavial previamente à colheita vem crescendo (CANÇADO et al., 2006).

Na colheita mecanizada, a palha permanece no sistema de cultivo de cana-de-açúcar favorecendo um maior aporte de carbono (C) a estes solos. A permanência deste resíduo vegetal-natural aumenta a retenção de água e também pode servir como reservatório de nutrientes, podendo elevar a concentração microbiana (CANTARELLA, 1998).

O aporte de palha em um canavial durante a colheita mecanizada inclui as folhas, as bainhas e o ponteiro das plantas, além de quantidade variável de pedaços de colmo, podendo variar de 10 a 20 t ha⁻¹ de matéria seca. Esse material contém de 40 a 80 kg de N ha⁻¹, potencialmente disponíveis à cultura após mineralização pelos micro-organismos do solo (ABRAMO FILHO et al., 1993). A quantidade de nitrogênio permanecendo no solo como palha no sistema de colheita mecanizada, pelos vários ciclos da cultura, representa pouco mais da quantidade do adubo nitrogenado empregado nas adubações de cobertura em soqueira de cana-de-açúcar, que atualmente está em torno de 100 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N (TRIVELIN et al., 2002).

Em consequência do desenvolvimento e expansão da área plantada, ocorrem aumentos no consumo de insumos, principalmente de fertilizantes nitrogenados, uma vez que o N é um dos nutrientes limitantes para manter a produtividade e a longevidade do canavial (CANTARELLA et al., 2008). Os fertilizantes minerais mais empregados atualmente são a ureia e o nitrato de amônio em dosagens de N variando entre 80 e 160 kg ha⁻¹, dependendo do clima da região, da variedade da cultivar e da produção esperada ao ano (UNICA, 2012).

2.1.2 Micro-organismos e emissões de GEE

Os micro-organismos pertencem à base da cadeia trófica e estão intrinsecamente associados aos diversos processos ecológicos do solo, além de responderem rapidamente às alterações impostas ao ambiente. Desta forma, a diversidade microbiana tem potencial para ser usada como indicador de qualidade do solo (BUNEMANN et al, 2006).

Os resíduos orgânicos de origem vegetal são a principal fonte de matéria orgânica para o solo, e a microbiota do solo é a principal responsável por sua decomposição, influenciando tanto na cinética da transformação da matéria orgânica e formação de húmus, quanto na estocagem de C e nutrientes (MATSUOKA, et al., 2003). Apesar de representar uma pequena fração do total da matéria orgânica do solo (MOS), os micro-organismos são essenciais para a manutenção das funções dos ecossistemas.

É sabido que no manejo de colheita mecanizada o C que seria emitido fica retido na palha e no solo. Pelos processos de decomposição microbiana do material orgânico, parte deste C volta à atmosfera, mas de forma mais lenta e gradual, o que permite o aumento do estoque de C no solo ao longo dos anos. Esse acúmulo de matéria orgânica pode aumentar a retenção de água e a resistência a variações de temperatura do solo, melhorar sua estrutura e porosidade, além de constituir um reservatório de nutrientes minerais.

Assim, os dois sistemas de manejo de colheita podem resultar em produtividades diferentes, pelo fato de haver maior aporte de matéria orgânica no sistema de colheita mecanizada. Por outro lado, garantindo este maior aporte de nutrientes essenciais à existência de micro-organismos através da manutenção da palha, este tipo de sistema pode estar contribuindo com maiores emissões de óxido

nitroso, necessitando-se avaliar mais profundamente as atuais técnicas de manejo do solo (CANÇADO et al., 2006).

Para que possam existir alternativas de manejo viáveis e ecologicamente corretas, faz-se necessária a realização de estudos que avaliem a contribuição da agricultura nas emissões dos gases de efeito estufa, principalmente o N_2O , que é proveniente do uso de fertilizantes nitrogenados, de modo a gerar um diagnóstico mais preciso e regional para as tomadas de decisões mitigadoras do aquecimento global (WATSON et al., 1990).

2.1.3 Ciclo do nitrogênio e emissão de N_2O

O processo metabólico de fixação biológica de nitrogênio molecular, que corresponde a uma redução do nitrogênio gasoso a íon amônio, é bastante importante para as plantas e animais, uma vez que fornece um composto nitrogenado assimilável pelos seres vivos (VIEIRA et al., 1991).

A fixação bacteriana do nitrogênio é um processo metabólico que necessita de energia para quebrar a ligação do nitrogênio ($N \equiv N$). Tal processo pode também ocorrer quimicamente na atmosfera, via descargas elétricas (relâmpagos), através da fixação industrial (indústria de fertilizantes) ou por processos de queima de combustíveis fósseis. Contudo, cerca de 65 % da fixação de nitrogênio na Terra são de origem biológica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A primeira transformação ocorrida no ciclo do nitrogênio no solo é a passagem de N-orgânico, presente na matéria orgânica, a amônio (NH_4^+), denominada “mineralização ou amonificação”. Cassini (2005) relata que todo o nitrogênio orgânico presente no solo está na forma $R-NH_x$ (aminas, amidas, iminas) e que, portanto, o primeiro produto de sua mineralização é o N-amoniaco (NH_3 e NH_4^+). Esta ação é desenvolvida por bactérias decompositoras.

Em seguida, como o segundo processo, tem-se a retenção do N-Inorgânico (NH_4^+) pela biomassa bacteriana, sendo este um processo que ocorre simultaneamente com a mineralização, onde o balanço entre mineralização e imobilização é positivo e depende de uma série de fatores, como o pH do solo e da umidade.

Após os processos de mineralização e imobilização ocorre a transformação do N- inorgânico, sob a forma de amônio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-),

processo definido como nitrificação. Esse processo consiste na oxidação do íon amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), sendo um processo estritamente aeróbio realizado por bactérias quimiolitotróficas gram-negativas da família *Nitrobacteriaceae* (*Nitrossomonas* e *Nitrobacter*), sendo dividida em duas fases: a nitrificação, que consiste na passagem de amônio a nitrito, realizada pelas bactérias *Nitrossomonas*, e a nitratação, que consiste na conversão de nitrito a nitrato, realizadas pelas bactérias *Nitrobacter* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Após a fixação do N_2 e conversão da amônia a nitrato, pela via da nitrificação, ocorre o processo de desnitrificação, que consiste na redução do nitrato (NO_3^-) para nitrogênio molecular (N_2). Esta reação está associada com a liberação de óxido nítrico (NO) e de N_2O . O NO é produzido por procariontes como um intermediário durante a desnitrificação quando compostos de nitrogênio oxidados são usados como aceptores de elétrons em condições limitadas de oxigênio (ZUMFT, 1997). Já o N_2O é um poderoso gás de aquecimento global, com potencial aproximadamente 300 vezes superior ao do CO_2 (STERN, 2006).

Sabe-se que o pH do solo, teor de umidade e de matéria orgânica são fatores importantes para a desnitrificação e produção de N_2O . A conversão de florestas em pastagens aumenta a disponibilidade imediata de nitrogênio no solo graças à rápida mineralização provocada pelo fogo, por ocasião da queima da biomassa vegetal derrubada, embora parte do nitrogênio seja perdido sob formas gasosas durante a queima. Aparentemente, pastagens novas libertam quantidades significativas de N_2O , dependendo do referido aumento na disponibilidade de nitrogênio para os micro-organismos desnitrificadores (SIMEK, et al, 2002). A Figura 1 representa o ciclo do nitrogênio e suas principais etapas.

Figura 1 – Esquema geral do ciclo do nitrogênio, destacando as atividades agrícolas (O'NEILL, 1993)

2.1.4 Microbiologia molecular e emissões de N_2O

Com o emprego da biologia molecular, tem sido possível avaliar mais facilmente e de forma mais sensível à estrutura das comunidades de micro-organismos no solo (ZILLI et al., 2003). Técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de micro-organismos coletados diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células, têm contribuído para o avanço nos estudos de ecologia microbiana (BENLLOCH et al., 1995).

As emissões de N_2O são altamente variáveis no solo e são principalmente produzidas pela desnitrificação biológica (WRAGE et al., 2004) e, sabe-se que a reação central da desnitrificação é catalisada por duas nitrito redutases (Nir) distintas, uma codificada pelo gene *nirS* que se liga ao citocromo *cd₁*, e outra codificada pelo gene *nirK* que atua de maneira dependente de cobre. Estes genes são responsáveis pela redução do nitrato a nitrito. Embora estruturalmente diferentes estes dois tipos de genes são funcionalmente e fisiologicamente equivalentes (GLOCKNER, et al., 1993).

Desde 1998, vários estudos relataram o uso de *nirK* e *nirS* como marcadores moleculares das bactérias desnitrificantes para estudar a sua diversidade nos

diversos ambientes (AVRAHAMI, et al., 2003). No entanto, a abundância de desnitrificantes no ambiente ainda é determinada por técnicas moleculares mais específicas e apenas o gene *nirS* tem sido mais utilizado para quantificar a comunidade de bactérias desnitrificantes usando PCR competitivo e PCR em tempo real, como abordagens de métodos independentes de cultivo (MICHOTÉY, 2000).

Além dos genes *nirK* e *nirS* como marcadores moleculares de desnitrificantes, outro processo mais diretamente ligado à produção de N_2O é a via a partir do óxido nítrico (NO), onde o gene principal envolvido é o *norB*, conforme mostrado na Figura 2.

A óxido nítrico redutase é codificada pelo gene *norB* e catalisa a redução de NO a N_2O , o que representa uma reação incomum na biologia, a formação de ligações N-N. A existência deste gene foi demonstrado pela ruptura mutacional dos genes nitrito redutase (*nirK* e *nirS*), indicando a formação de óxido nitroso a partir de óxido nítrico e, assim, desvendado o caminho completo da desnitrificação *in vivo* (HENDRIKS et al., 2000).

O gene *norB* leva duas denominações, *qnorB* derivado do quinol óxido redutase e *cnorB* derivado do citocromo óxido redutase. Ambos ocorrem em cepas de bactérias desnitrificantes (CANFIELD, et al., 2011). A atividade deste gene (*norB*), proveniente do NO resulta na formação do óxido nitroso, que é o substrato onde atua o gene *nosZ*, transformando o óxido nitroso em nitrogênio molecular (PHILIPPOT, et al., 2005).

O gene *nosZ* pode ser usado como um alvo para as diferentes populações de bactérias desnitrificantes capazes de reduzir o óxido nitroso diretamente a nitrogênio molecular. O gene *nosZ* também atua como um bioindicador na qualidade ambiental deste solo, qualificando-o como solos com elevado potencial de desnitrificação (CANFIELD, et al., 2011). Obviamente, fazer um balanço real entre produção e consumo de N_2O requer um acompanhamento específico e temporal no sistema de manejo escolhido, pois as quantificações de genes desnitrificantes podem acabar expressando uma condição viável naquele determinado momento, necessitando de análises diárias e de severos cuidados na manipulação de amostras de solos e demais requisitos laboratoriais.

Portanto, para se realizar um estudo ampliado e específico na geração de N_2O , utilizando técnicas moleculares, necessita-se avaliar a atividade destes principais genes: *norB*, *nirS*, *nirK* e *noZ*. Quantificar valores de emissões de GEE,

especialmente o N_2O , e tentar correlacionar de alguma forma estes valores à presença ativa de micro-organismos responsáveis por este potencial de emissão é um desafio que une cada vez mais as áreas das pesquisas tecnológicas.

Cabe ressaltar que, embora as emissões de N_2O sejam oriundas por parte de reações bioquímicas de nitrificação e de desnitrificação biológica, este trabalho avalia apenas bactérias desnitrificantes e toda discussão está baseada nesta situação.

Figura 2 – As principais vias de transformação biológica do nitrogênio. Genes que codificam enzimas que conduzem as transformações importantes incluem as nitrito redutase (*nirS* e *nirK*), óxido nítrico redutase (*norB*), óxido nitroso redutase (*nosZ*). Adaptado de (Canfield, et al., 2011)

2.1.5 PCR quantitativo em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais comumente utilizado é o corante *SYBR GreenI*, que possui a capacidade de intercalar a dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521nm. O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, é alcançado o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção - *cycle threshold*). Este valor de Ct

é utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR (KUBISTA et al., 2006).

Utilizando a técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias tem sido alvos de quantificação. A bactéria patogênica de citros *Xylella fastidiosa* foi quantificada por meio da aplicação desta técnica (OLIVEIRA et al. 2002).

Em relação à funcionalidade de populações microbianas, a utilização da qPCR permite quantificar grupos ativos no solo, utilizando genes determinantes em importantes funções como os envolvidos com a desnitrificação diretamente ligados a produção de N_2O e redução à N_2 .

Apesar de algumas limitações da utilização de PCR para obtenção de amplicons representativos de uma comunidade devido à amplificação preferencial de algumas sub-populações mais abundantes, em detrimento das menos abundantes (LAMBAIS et al., 2005), esta técnica possibilita a estimativa da diversidade microbiana em função de alterações no ambiente (poluição, manejo agrícola etc.), principalmente no solo.

2.2 Material e Métodos

Todos os objetivos deste projeto fazem referência às seguintes condições de manejo da cultura de cana-de-açúcar (cana soca): I – Colheita mecanizada sem queima prévia da palha da cultura (denominação: com palha) e II – Colheita manual com queima prévia da palha da cultura (denominação: sem palha).

As coletas de solos e gases foram desenvolvidas em uma fazenda pertencente a uma usina de cana-de-açúcar e álcool, localizada no município de Piracicaba. A variedade de cana-de-açúcar avaliada para o tratamento com palha é RB 85 5156; para o tratamento sem palha é RB 86 7515. A reforma do solo para instalação do canavial ocorreu há 6 anos. As análises laboratoriais foram realizadas em Piracicaba, no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental – CENA-USP, com apoio do Laboratório de Microbiologia Molecular – ESALQ-USP.

2.2.1 Incubação de amostras de solo em condições controladas (incubações em laboratório)

2.2.1.1 Análises químicas do solo e da palha

Os solos das duas condições de manejo (com e sem palha), classificados como Latossolo Vermelho, foram coletados em campo, com gradagem, tendo a camada 0-10 cm como padrão. Para todas as análises foram utilizadas 3 repetições de campo. A textura dos solos foi classificada como argilosa e os valores das análises químicas estão descritos na Tabela 1. Todas as análises químicas foram realizadas no Depto de Ciência do Solo – ESALQ-USP.

Tabela 1 – Análises químicas dos solos de diferentes manejos de cultivo de cana-de-açúcar na camada 0-10 cm

Tratamentos	pH (água)	C e N totais g kg ⁻¹	CTC	Argila %	Silte %	Areia %	Densidade g cm ⁻³
Sem palha	5,3	20 e 1,8	120	43	20	37	1,4
Com palha	6,2	29 e 2,6	90	40	24	36	1,1

No mesmo período de coleta dos solos para análises e incubação, foram coletados os resíduos da cultura (palha) de cana-de-açúcar em seguida enviados ao Depto de Ciência do Solo – ESALQ-USP para análise bromatológica, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise bioquímica da palha adicionada às amostras de solo

Celulose	400,2 g kg ⁻¹ de matéria seca
Hemicelulose	330,1 g kg ⁻¹ de matéria seca
Lignina	90 g kg ⁻¹ de matéria seca
Teor de C	365 g kg ⁻¹
Teor de N	6,0 g kg ⁻¹
Relação CN	60

2.2.1.2 Metodologia de incubação dos solos e análises de N-N₂O

As amostras do solo e das palhas coletadas na usina foram levadas ao laboratório de Biogeoquímica Ambiental e os 6 tratamentos avaliados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Tratamentos avaliados sob condições controladas

Solos sem palha	Solos com palha
1 – Testemunha ou sem fertilizantes (TEST)	4 – Testemunha ou sem fertilizantes (TEST)
2 – Ureia como fertilizante nitrogenado (UR)	5 – Ureia como fertilizante nitrogenado (UR)
3 – Nitrato de Amônio como fertilizante nitrogenado (N.A)	6 – Nitrato de Amônio como fertilizante nitrogenado (N.A)

No laboratório os solos foram homogeneizados e peneirados a 2 mm. A umidade do solo foi determinada em uma alíquota seca em estufa a 105 °C por 72 horas, posteriormente corrigida para 60 % da capacidade de campo. Em seguida os solos foram colocados em frascos de vidro, de 1,5 dm³.

Durante todo o período de estabilização e amostragem dos gases, os frascos com 300 gramas do solo dos tratamentos com e sem palha foram fechados e mantidos dentro do laboratório a uma temperatura entre 24,5 e 26 °C conforme mostrado na Figura 3A. Cada tampa utilizada nos frascos possui uma junta de borracha de silicone para fechamento hermético e na parte superior foi instalado um tubo equipado com uma válvula de retenção para retirada das amostras de gases. Passado o período de estabilização de mais ou menos 24 horas, a quantidade de fertilizante aplicada foi equivalente a 120 kg ha⁻¹ de N, referente ao Nitrato de Amônio e à Ureia. Após a aplicação do N, os frascos foram mantidos em repouso por mais 2 horas. Depois deste período, os frascos foram ventilados manualmente e, finalmente fechados para a realização da primeira amostragem. Para a amostragem, os frascos permaneceram incubados por 30 minutos e, todo este procedimento de

coleta do gás e correção da umidade foi realizado por 30 dias, no intuito de observar as variações nos valores de N-N₂O emitidos.

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 no momento em que se obtivesse os maiores valores na emissão de N-N₂O, de forma a não desestruturar os demais frascos durante os 30 dias de análises. Assim que foram obtidos os maiores valores de N-N₂O (pré-avaliados e próximos do 14º dia de incubação dos solos), o solo destes frascos paralelos foram coletados e armazenados em sacos plásticos a -20 °C para dar procedência às demais análises microbiológicas.

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 e que não interferisse nas emissões de N₂O via ação microbiana.

As amostras com N₂O foram armazenadas em seringas do tipo BD (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda) de nylon de 20 mL contendo uma válvula de retenção acoplada e analisadas após o termino da coleta. O óxido nitroso foi separado do ar nas amostras no equipamento Shimadzu® GC-mini (Figura 3B), em que a fase estacionária é composta por uma coluna empacotada Porapak Q® (80-100 mesh) operando a 80 °C. Após a separação, o gás foi ionizado com uma fonte de ⁶³Ni e o N₂O foi quantificado por um detector de captura de elétrons (ECD) operando a 325 °C. A calibração do equipamento foi realizada com dois padrões certificados White-Martins com concentrações mínimas e máximas respectivamente de 292 e 1115 ppb. Os fluxos foram calculados pela alteração linear da concentração de gás com o tempo de incubação nos frascos, mostrado na equação 1.

$$Fluxo = \left(\frac{\delta[N_2O]}{\delta.t} \right) * \left(\frac{V_h}{A} \right) * \left(\frac{\left(\frac{1-e}{P} \right)}{V_m} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde: $(\delta [N_2O] / \delta t)$ é a alteração da concentração de N_2O em função do tempo ($\text{mol } N_2O \text{ mol}^{-1} \text{s}^{-1}$); V_h é o volume do frasco (cm^3); A é a área (cm^2); $(1-e)/P$ é o potencial de pressão atmosférica (kPa kPa^{-1}); V_m é o volume molar ($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$).

Figura 3 – Incubação de solos de cana-de-açúcar. A – Esquema dos frascos de incubação de solos de cana-de-açúcar com as seringas utilizadas na coleta de N_2O . B – Analisador de gás: Cromatógrafo Shimadzu® GC-mini

As amostragens foram conduzidas durante o período necessário para que os fluxos de $N-N_2O$ nos tratamentos apresentassem diferença inferior a 5 % em relação ao tratamento controle.

Nos valores médios obtidos foi determinada a variância (ANOVA) comparada pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, para caracterizar as diferenças entre os tratamentos. Desta forma, valores fora da distribuição normal foram desconsiderados e tratados como parcelas perdidas do fator tratamentos.

2.2.1.3 C e N da biomassa microbiana do solo

Para a quantificação de carbono e nitrogênio microbianos do solo foi utilizada a metodologia baseada no método da extração-fumigação-FE (VANCE et al., 1987). Para esta análise foi escolhida a camada 0-10 cm, nas linhas do cultivo de cana-de-

açúcar e os tratamentos avaliados foram os mesmos das análises de N₂O em incubação, coletados no 1º, no 14º e no 30º dia de incubação, sendo o primeiro dia como o ponto inicial do experimento, o décimo quarto dia o momento de maior emissão de N₂O e o trigésimo dia como sendo o momento de estabilização das emissões de N₂O, conforme pré-avaliados em experimentos anteriores ao desenvolvimento final deste trabalho.

As amostras de solo tiveram um ajuste na umidade, na qual a capacidade total de retenção de água (capacidade de campo) foi ajustada para 60 %. As amostras de solo foram peneiradas e incubadas por 24 horas a -0,03 MPa na presença de clorofórmio e respectivos controles e então extraídas com K₂SO₄ 0,5 M e filtradas. Em seguida os extratos foram analisados quanto ao teor de C e N-orgânico no aparelho Shimadzu® TOC- 5000A.

Com relação às análises estatísticas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

2.2.1.4 Análises moleculares

2.2.1.4.1 Extração do DNA total do solo de cana-de-açúcar

Os tratamentos avaliados nesta etapa foram os mesmos das análises de N₂O em incubação e da biomassa microbiana do solo durante o primeiro, décimo quarto e trigésimo dia de incubação dos solos.

Para extração do DNA total do solo foi utilizado o *Kit PowerSoil DNA Isolation* (MoBio Laboratories, EUA). Foi adicionado 0,5 g de solo em microtubos contendo granada finamente moída e as células lisadas por agitação horizontal a 4 ms⁻¹ por 5 segundos. Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. Para observar a integridade do DNA e quantificá-lo, uma alíquota de 5 µL foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1x (Tris, Ácido acético, EDTA) adicionado ao corante *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). Como padrão molecular, foi utilizado 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo eletroforético de 80 V por 30 minutos. A aquisição da imagem do gel foi feita utilizando-se o densitômetro *Storm™* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisada pelo programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

2.2.1.4.2 PCR quantitativo em tempo real

As análises de qPCR foram realizadas para quantificação do gene 16S DNAr de bactérias e dos genes de desnitrificantes (*nirK*, *nirS*, *nosZ* e *norB*) em amostras ambientais de solos com cultivo de cana-de-açúcar.

Os *primers* e as condições de amplificação estão descritos na Tabela 3. As reações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) utilizando o sistema *SYBR GreenI*. O equipamento utilizado está disponível no laboratório de Microbiologia Molecular da ESALQ/USP. Todas as reações de qPCR foram realizadas em volume de 25 µl contendo 12.5 µl do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Brasil), e os *primers* na concentração de 10 µM. Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72° à 96°C para verificar a especificidade da amplificação.

A aquisição dos dados foi feita através do *software Rotor Gene Real Time Analysis 1,7,65* (Corbett) que é capaz de calcular os valores de *cycle threshold* (*Ct*), a correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (*E*). Diluições de uma PCR realizada com cada par de *primer* para amplificação dos diferentes genes (Tabela 3) foram utilizadas para amplificação do DNA e obtenção das curvas padrão. Este processo serviu como ponto inicial para cálculo da quantificação dos genes nas amostras, sendo que os valores de *CTs* obtidos para cada amostra em cada uma das quantificações foram utilizados para determinar a quantidade absoluta do DNA alvo nas amostras ambientais.

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 ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Genes alvo do presente estudo, quantificados por meio de PCR quantitativo em tempo real

Gene alvo	Primers	Sequência (5'-3')	Perfil térmico	Referência
16S rRNA	F563	AYTGGGYDTAAAGNG	95°C/ 5 min, 40 ciclos	(1)
	BSR926	CCGTCAATTYYTTTTRAGTTT	(95°C/ 15 seg, 55°C/ 30 seg, 72°C/ 60 seg), 72°C/ 5 min.	
<i>nirS</i>	Cd3aF	GTSAACGTSAAGGARACSGG	95°C/ 3 min, 40 ciclos	(2)
	R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	(95°C/ 45 seg, 57°C/ 45 seg), 72°C/ 45 seg), 72°C/ 5 min.	(3)
<i>nirK</i>	F1aCu	ATCATGGTSCGTGCCGCG	95°C/ 3 min, 40 ciclos	(4)
	R3Cu	GCCTCGATCAGRTTGTGGTT	(95°C/ 45 seg, 57°C/ 45 seg), 72°C/ 45 seg), 72°C/ 5 min.	
<i>norB</i>	cnorBbF	AIGTGGTCGAGAAGTGGCTCTA	95°C/ 15 min, 40 ciclos	(5)
	cnorBbR	TCTGIACGGTGAAGATCACC	(95°C/ 15 seg, 68-62°C (-1°C por ciclo)/ 60 seg, 81,5°C/ 30 seg).	
<i>nosZ</i>	nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	95°C/ 3 min, 45 ciclos	(6)
	nosZ2R	CAKRTGCAKSGCORTGGCAGAA	(95°C/ 15 seg, 65-59°C (-1°C por ciclo)/ 30 seg, 72°C/30 seg).	

N = ACGT; Y = CT; R = AG; D = GAT; S = CG; M = AC; K = GT;

(1) CLAEISSON et al., 2010; (2) MICHOTÉY et al., 2000; (3) THROBACK et al., 2004; (4) HALLIN; LINDGREN, 1999; (5) DANDIE et al., 2007; (6) HENRY et al., 2006.

2.2.2 Análises do solo de cana-de-açúcar em condições naturais (no campo de cultivo)

2.2.2.1 Caracterização da área e tratamentos avaliados

Para realização das coletas de solos e análises de N-N₂O foi instalado um experimento no campo de cultivo de cana-de-açúcar. Os tratamentos avaliados estão mostrados no Quadro 2.

Quadro 2 – Tratamentos avaliados sob condições de campo, mostrando o tipo de manejo do solo e o fertilizante utilizado nas análises diárias

Sem palha	Com palha	Palha artificial
1 – Testemunha	3 – Testemunha	5 – Testemunha
2 – Nitrato de amônio	4 – Nitrato de amônio	6 – Nitrato de amônio

O tratamento sem palha refere-se ao período de queima do canavial ocorrido 90 dias antes da realização deste experimento. Já o tratamento com palha, refere-se à manutenção da palha nas linhas e entrelinhas e, cabe ressaltar que a reforma no solo para instalação do canavial ocorreu há 6 anos neste local.

Outro tratamento avaliado foi a palha artificial que se baseia no emprego de fitilhos de plástico lavado e seco em estufa a 60°C, para simular a palha natural, pois, tornou-se necessário observar possíveis emissões de N₂O desta última em função da desnitrificação endofítica conforme descrito no trabalho de Compant et al. (2005).

O fertilizante nitrogenado escolhido para este item (nitrato de amônio) foi o mesmo empregado pelos agricultores responsáveis naquela região de estudo na dosagem de 120 kg ha⁻¹ e foi aplicado no momento do primeiro dia de análise. A palha foi mantida no local no equivalente a 7 toneladas ha⁻¹.

2.2.2.2 Análises químicas do solo e da palha

Os solos e os resíduos culturais utilizados neste experimento no campo possuem as mesmas características químicas descritas no item 2.2.1.1, pois se trata de uma mesma região de estudo para desenvolvimento deste trabalho. Contudo, o valor da umidade dos solos (capacidade de retenção de água) estava acima de 70% entre o 3º e 8º dia.

2.2.2.3 Análises de N-N₂O no campo de cultivo

Para determinar as emissões de N-N₂O em campo de cultivo foram instaladas câmaras estáticas nas linhas de cultivo de cana-de-açúcar segundo a concepção de Bowden et al. (1990), representado na Figura 4A. O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados com cinco repetições.

Conservaram-se os resíduos culturais no interior das bases no tratamento com palha (Figura 4B) e paralelamente avaliou-se o tratamento com palha artificial (Figura 4C) e sem palha (Figura 4D). No momento das amostragens foi colocada uma tampa sobre as bases de maneira a isolar o ambiente interno do externo, as amostras de gases provenientes do solo foram coletadas em seringas do tipo BD de nylon de 20 mL contendo uma válvula de retenção acoplada. O intervalo de tempo

de retirada das amostras foi de 0, 10 e 20 minutos. Durante cada amostragem foi feita a determinação da temperatura ambiente e do solo a 5 cm e coletados os solos para determinação da umidade.

Figura 4 – Câmaras para coleta de N_2O . A – Câmara e seringas utilizadas na coleta do gás. B – Câmara no tratamento com palha. C – Câmara com palha artificial. D – Câmara no tratamento sem palha

As análises de $N-N_2O$ foram realizadas nos mesmos dias da coleta em um período total de 30 dias. As amostras coletadas nas seringas foram encaminhadas para o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental e analisadas no equipamento Shimadzu® GC, onde a separação do gás no interior do aparelho funciona sob as mesmas condições discutidas no item 2.2.1.2.

Também foram calculados os valores médios, onde foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, para caracterizar as diferenças entre os tratamentos.

O fator de emissão de N-N₂O do fertilizante nitrogenado (FE_{fert}) para cada fertilizante avaliado foi calculado segundo descrito no IPCC (2006), conforme a equação 2.

$$FE_{fert} = \left(\frac{\Sigma_{N_2O} - \Sigma_{Co}}{N_{apl.}} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde: Σ_{N_2O} é a emissão integral do N₂O; Σ_{Co} é a emissão de N₂O da área controle; $N_{apl.}$ é a quantidade de N aplicada na forma de fertilizante.

Nos resultados obtidos para cada tempo de amostragem foi determinado a variância (ANOVA). Desta forma, valores fora da distribuição normal foram desconsiderados e tratados como parcelas perdidas do fator tratamentos.

2.2.2.4 C e N da biomassa microbiana e N-inorgânico no solo

O C e N da Biomassa microbiana do solo (BMS) foi quantificado no solo dos 6 tratamentos mencionados no item 2.2.2.1. As amostras foram coletadas no campo de cultivo e no mesmo momento das coletas de N₂O.

A camada avaliada foi a de 0-10 cm e os pontos das coletas do solo foram escolhidos aleatoriamente ao redor das câmaras de gases (nas linhas de cultivo), sem danificá-las. Cada 3 pontos, distantes cerca de 50 cm entre si geravam uma amostra composta (misturada e homogeneizada), formando no total 3 repetições biológicas e totalizando diariamente 18 amostras, conforme mostrada no Quadro 3.

As análises das 18 amostras não foram realizadas durante os 30 dias de coletas de gases em função do número de repetições e demanda de equipamentos, portanto foram escolhidas as seguintes datas:

- 1º e 30º dias: Início e término do experimento, respectivamente.
- 4º, 8º, e 15º dias: Maiores emissões de N-N₂O, em função do elevado período de chuva.

Quadro 3 – Manejos e tratamentos divididos e escolhidos para coleta das amostras de solo para análise do C e N da BMS e do N- mineral

Manejos	Tratamentos	Pontos ao redor da câmara	Total de amostras (repetições)
Sem palha	TEST.	9	3
	N.A	9	3
Com palha	TEST.	9	3
	N.A	9	3
Palha artificial	TEST.	9	3
	N.A	9	3
			Total de 18 amostras por análise

Aproximadamente 100 g de cada amostra de solo foram coletadas diariamente com as respectivas coletas de gases, colocadas em sacos plásticos com respiro de papel e dispostas em uma caixa de isopor com gelo seco. Em seguida, as amostras eram levadas ao laboratório para demais procedências.

No laboratório, uma parte das amostras era separada em sacos menores e em seguida congelada a -20 °C que seriam utilizadas nas análises moleculares e a outra parte era peneirada a 2 mm e corrigidas as umidades em 60 % da capacidade de campo para que então, fossem incubadas por 24 horas na presença de clorofórmio. A seguir, as amostras e seus respectivos controles foram extraídos com K_2SO_4 0,5 M e filtradas. Os extratos foram analisados quanto ao teor de C e N-orgânico no aparelho Shimadzu® TOC- 5000A.

As concentrações de N-inorgânico ($N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$) foram determinadas no Depto de Ciência do Solo – ESALQ-USP.

Com relação aos resultados, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2.2.5 Análises moleculares

2.2.2.5.1 Extração do DNA total das amostras de solo e da palha de cana-de-açúcar

Para dar procedência à extração do DNA total do solo, as 18 amostras coletadas no campo (compostas a partir dos 3 pontos escolhidos no campo e com 3 réplicas de laboratório) dos 5 dias escolhidos para análises (1°, 4°, 8, 15° e 30° dias) foram separadas e armazenadas a -20 °C. Em seguida tiveram seu DNA extraído seguindo os parâmetros do item 2.2.1.4.1.

Também foi extraído o DNA total da palha de cana-de-açúcar, no intuito de verificar uma possível existência de bactérias desnitrificantes nestes resíduos. A palha fresca foi coletada no campo, e a extração foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Murray e colaboradores (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al., 1997. Aproximadamente 5 g de palhas frescas foram lavadas e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (1 % CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7M NaCl; 2 % sarcosil; 2 % mercaptoetanol) e incubados à 60 °C. Após o resfriamento, foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e os tubos foram agitados e centrifugados. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com o mesmo volume de CTAB e novamente centrifugado. O sobrenadante foi novamente centrifugado e o sedimentado ("pellet") formado dissolvido em 80 µL de TE, com alta concentração de NaCl (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1M NaCl) à 65 °C, até completa dissolução. Posteriormente, após resfriamento, o DNA foi precipitado com 160 µL de etanol 100 % e colocado a - 20°C por 12 horas. Posteriormente, foi centrifugado por 6 minutos a 9.300 g. O DNA obtido foi dissolvido em 80 µL de H₂O MilliQ contendo 10 µg/µl de RNase para a eliminação completa de contaminação por RNA.

2.2.2.5.2 PCR quantitativo em tempo real

Para as análises de PCR em tempo real, foi utilizado o DNA produto das extrações de solo e de palha referente ao item anterior.

A procedência metodológica para quantificação do gene 16S DNAr de bactérias e dos genes envolvidos na desnitrificação (*nirS*, *nirK*, *norB* e *nosZ*) para o solo e para a palha, segue o que foi descrito no item 2.2.1.4.2.

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 ($p < 0,05$).

2.2.2.5.3 Influência da queima da palha de cana-de-açúcar na desnitrificação

Para determinar se a queima da palha de cana-de-açúcar exerce alguma influência na quantidade de bactérias desnitrificantes, foi realizado um experimento em paralelo ao do estudo no campo, onde foram empregados os seguintes tratamentos: I – Com palha: colheita mecanizada sem a queima do cultivo (Figura 5A), II – Sem queima e ao mesmo tempo com a palha retirada da linha do cultivo (Figura 5B) e III – Sem palha: colheita manual precedida pela queima da palha (Figura 5C).

Estes solos pertencem ao mesmo local onde foram realizadas as análises de N_2O e demais análises microbiológicas em campo de cultivo. Contudo, nenhum fertilizante foi adicionado ao solo neste local e neste período. Nos solos sem queima e sem a palha, a quantidade desta última que permanecia na linha do cultivo foi retirada por um período de 30 dias antes de realizar as análises. Os solos foram coletados na camada 0-10 cm em 5 pontos na linha do cultivo de cana-de-açúcar, gerando uma amostra composta, com 3 repetições. O DNA total do solo foi extraído em laboratório e em seguida foi realizada a quantificação do gene *nirS* (THROBACK et al. 2004) por qPCR seguindo a mesma metodologia que foi usada para os demais genes.

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 ($p < 0,05$).

Figura 5 – Solos de cana-de-açúcar sem aplicação de fertilizantes nitrogenados. A – Solos com palha: colheita mecanizada sem a queima do cultivo. B – Solos sem queima e ao mesmo tempo com a palha retirada da linha do cultivo. C – Solos sem palha: colheita manual precedida pela queima da palha

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Experimentos em condições controladas (incubações em laboratório)

2.3.1.1 Emissão de N-N₂O

Com os dados dos fluxos de N-N₂O obtidos por cromatografia gasosa, tornou-se possível calcular as emissões diárias e acumuladas deste gás. Estes fluxos estão apresentados em mg.m⁻².h⁻¹.

Cabe ressaltar que a coleta e as análises foram realizadas diariamente e sempre nos mesmos frascos de solos incubados.

Emissões diárias

As emissões diárias de N-N₂O dos tratamentos com e sem palha sob condições controladas estão representadas na Figura 6.

As emissões diárias de N-N₂O nos tratamentos sem a aplicação de fertilizante nitrogenado (testemunha) ficaram próximas de zero, chegando ao valor máximo de 0,05 mg.m⁻² h⁻¹ nos 30 dias de incubação na condição de manejo com a palha. Portanto, são significativamente menores quando comparadas aos demais tratamentos onde foram aplicados os fertilizantes nitrogenados (p<0,05). Até o 8º dia não foi possível observar alterações nos fluxos de emissões para nenhum tratamento, tanto para as condições de manejo.

As maiores emissões diárias de óxido nitroso ocorreram próximas ao 14º dia após a aplicação dos fertilizantes nitrogenados e sob a condição da manutenção da palha ao solo, apresentando diferenças significativas (p<0,05) entre os valores obtidos, sendo de 0,45 mg.m⁻² h⁻¹ nos solos sem a palha e 0,8 mg.m⁻² h⁻¹ em solos com a palha. Estes valores estabilizaram-se após o 18º dia chegando ao 30º dia com valores próximos a zero.

Figura 6 – Emissões diárias de N- N_2O em solos de cana-de-açúcar sob condições controladas. A – Simulação de solos sem a palha. B – Simulação de solos com a palha. TEST – Testemunha; UR – Ureia e NA – Nitrato de amônio

Emissões acumuladas

Os valores acumulados das emissões de N- N_2O estão mostrados na Figura 7.

As curvas que representam o somatório das emissões de N- N_2O para ambos os sistemas de manejo avaliados (com e sem palha) estão muito próximas do 1º até o 30º dia após a aplicação do equivalente a 120 kg ha⁻¹ de N aplicado ao solo na forma de nitrato de amônio e de ureia. Para a condição sem palha, o valor

acumulado destas emissões atingiu $4 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, já para a condição com a palha este valor se aproximou de $7 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Figura 7 – Emissões acumuladas de $\text{N-N}_2\text{O}$ em solos de cana-de-açúcar sob condições controladas. A – Simulação de solos sem a palha. B – Simulação de solos com a palha. TEST – Testemunha; UR – Ureia e NA – Nitrato de amônio

As equações que descrevem as emissões acumuladas para os tratamentos de testemunha, ureia e nitrato de amônio sob as condições de manejo com e sem palha estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Equação que descreve as emissões acumuladas de N-N₂O para os tratamentos e condições de manejo avaliadas em campo. (p<0,05)

Manejo	Testemunha	Nitrato de amônio	Ureia
Sem palha	$y = 0,0055x + 0,0168$ $R^2 = 0,9118$	$y = 0,1766x - 0,5871$ $R^2 = 0,9284$	$y = 0,1787x - 0,6001$ $R^2 = 0,9368$
Com palha	$y = 0,037x - 0,0232$ $R^2 = 0,9955$	$y = 0,284x - 0,8763$ $R^2 = 0,9289$	$y = 0,288x - 0,9523$ $R^2 = 0,9274$

A redução biológica do N-nitrato pode ocorrer tanto na desnitrificação quanto na nitrificação e nestes dois processos ocorre produção de óxido nitroso. A disponibilidade simultânea do N-nitrato e do N-amônio favorece a emissão quando a fonte aplicada é o nitrato de amônio (BOUWMAN, 1998).

A ureia quando aplicada reage rapidamente em contato com a água no solo mediada pela enzima denominada urease. Esta reação processa-se em duas fases, sendo que na primeira há liberação NH₃ e CO₂, enquanto que na segunda fase forma-se N-amônio e radicais hidroxila, que, juntamente com o CO₂ liberado na primeira etapa podem ocasionar a redução do H⁺ livre na solução do solo, nestas condições ocorre a elevação do pH do solo (LARA-CABEZA et al., 2008). Esta situação, aliada às condições favoráveis de umidade promove uma rápida disponibilização do N-fertilizante aos micro-organismos do solo. Uma forma de se evitar este processo é por meio do uso de inibidores da atividade da urease ou qualquer outra forma de proteção da liberação do N-fertilizante.

Ciarlo et al. (2008) mostraram que as emissões de N₂O são maiores quando utilizado o nitrato de amônio do que a ureia, em amostras não deformadas de solo, indicando que a possível origem destas emissões tenha sido realizada por desnitrificação. Zhang et al.(2009) trabalhando com amostras deformadas de solo mostraram que a adição de amônio no solo sob a forma de nitrato favorece emissões de N₂O quando associadas ao fator umidade.

Cabe ressaltar que, para este experimento, as amostras de solos são deformadas, tamisadas a 2 mm e com a umidade mantida em 60 % da capacidade de campo durante os 30 dias de incubação do solo e, portanto, supõe-se que a origem destas emissões de N₂O são de natureza desnitrificante. Sendo assim, a

análise molecular realizada neste trabalho, quantificando os genes de bactérias desnitrificantes presentes no solo, serviu como um auxílio à discussão sobre a origem deste gás de elevado potencial de aquecimento global.

Emissões médias de N-N₂O e fator de emissão

Os valores médios das emissões de N-N₂O estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Emissões médias de N-N₂O e erro padrão (n=5) para os tratamentos testemunha e nitrato de amônio sob as condições avaliadas no laboratório

Manejo	Tratamento	Emissões médias de N-N ₂ O (mg.m ⁻² h ⁻¹)
Sem palha	TEST	0,01±0,002 a
	NA	0,27±0,03 b
	UR	0,22±0,04 b
Com palha	TEST	0,03±0,002 a
	NA	0,58± 0,07 c
	UR	0,52±0,1 c

Letras comparam as médias entre os sistemas de manejo (Sem palha e Com palha). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os valores das emissões médias de N-N₂O não se diferenciaram estatisticamente com relação ao tratamento testemunha sob as condições de manejo avaliadas. Para o sistema com manutenção da palha, foram encontrados os maiores valores médios nos fluxos de N-N₂O com diferenças significativas entre o tipo de manejo.

Entre os tratamentos só foi possível observar diferença estatística (p<0,05) entre solos com a aplicação de fertilizantes e o tratamento testemunha, demonstrando que não há diferenças significativas entre os valores médios emitidos pelo solo com adição de ureia e com nitrato de amônio.

A partir das emissões médias foram calculados os fatores de emissão de N-N₂O em função do tratamento avaliado. O fator de emissão neste trabalho se situou

próximo de 0,3 % para o NA e para a UR no manejo sem palha. Para o manejo com palha este fator chegou a 0,7 % para o NA e para a UR.

Carmo et al. (2012) também encontraram valores de fator de emissão de N- N_2O abaixo de 3 % e estes valores superavam os 3 % quando a fonte de N aplicado ao solo era mineral e na presença de 14 Ton. ha^{-1} de palha sobre o solo.

Enfim, os valores encontrados neste estudo, realizado em laboratório, não estão além dos limites de incerteza do padrão estabelecido pelo IPCC (2012) - 0,03 a 3 %.

2.3.1.2 Estimativas do C e N da biomassa microbiana do solo

A BMS possui um tempo de residência no solo muito curto respondendo rapidamente a diversas alterações ambientais e condições do manejo. De certa forma, a biomassa microbiana é definida como a parte viva da matéria orgânica, representa de 2 a 4 % do carbono total do solo (FEIGL et al. 1995).

Nos experimentos efetuados, o C-microbiano no tratamento testemunha não se diferenciou estatisticamente das condições de manejo, situando-se próximo ao valor de 200 kg ha^{-1} para todos os dias em que foi avaliado, conforme mostrado na Figura 8.

Para os solos com a aplicação de fertilizantes nitrogenados o C-microbiano chegou a 650 kg ha^{-1} no 14º dia para o sistema de manejo com a manutenção da palha. Este elevado valor manteve-se no 30º dia diferenciando-se estatisticamente ($p < 0,05$) do sistema sem a palha.

O N-microbiano também não se alterou no tratamento testemunha para todas as condições de manejo avaliadas, chegando a 20 kg ha^{-1} , 10 vezes menor que o C-microbiano nestas condições. Para os solos com a aplicação de fertilizantes, este N-microbiano atingiu 150 kg ha^{-1} nos 14º e 30º dias do período de incubação para o sistema com palha, seguindo o mesmo padrão gráfico do C-microbiano, porém quase 5 vezes menor. Neste mesmo período, os valores obtidos para os solos com fertilizantes e com palha diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) dos solos sem a palha.

Figura 8 – BMS na camada 0-10 cm nas 3 datas avaliadas durante a incubação do solo. A – C-microbiano. B – N-microbiano. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizantes); NA – Solo com aplicação nitrato de amônio; UR – Solo com aplicação de ureia. * Indica diferença significativa no C e N-microbiano entre os manejos com e sem palha para solos com NA ($p < 0,05$). # Indica diferença significativa no C e N-microbiano entre os manejos com e sem palha para solos com UR ($p < 0,05$)

A relação C:N da BMS para os tratamentos NA, com aporte de palha chegou a 4,3. Já para as suas respectivas testemunha, este valor foi de 10.

É notório que os elevados valores de C e N microbianos observados nos 14º e 30º dia da incubação do solo deva-se a aplicação dos fertilizantes nitrogenados empregados neste estudo. Assim como, a diferença obtida entre os manejos com e sem a palha neste mesmo período.

Estes valores acompanham os altos fluxos de N_2O nos mesmos períodos, indicando que a ação microbiana possui relação direta nas emissões deste gás. É possível que a manutenção da palha também tenha influência na BMS e a provável explicação segue o mesmo raciocínio utilizado na análise dos resultados dos gases, onde a retenção da umidade provocada pela palha possa favorecer a quantidade de micro-organismos nos solos.

Além do aporte de resíduos orgânicos em superfície, as gramíneas promovem a liberação de exsudados ricos em carboidratos e proteínas e que estão mais disponíveis para os micro-organismos (SILVA, et al., 1997). Assim sendo, os micro-organismos utilizam o carbono da palha da cana para a biossíntese e, como fonte de energia, eles acabam imobilizando o N mineral do solo, justificando as elevadas diferenças entre o C e o N microbiano (AITA et al., 2001).

É importante destacar que a avaliação dos resultados do N-microbiano deve ser bem analisada, uma vez que uma alta atividade biológica pode ser resultado tanto de um grande reservatório de C e N lábeis, em que a decomposição é intensa (por exemplo, áreas de vegetação nativa), como da oxidação da matéria orgânica do solo proveniente da quebra de agregados pela ação antrópica, ou ainda, como resultado da adição momentânea de resíduos orgânicos, como é o caso deste estudo, onde foram encontrados elevados valores de C e N nos tratamentos com a manutenção da palha. Assim, altos teores de N microbiano podem indicar tanto uma situação de distúrbio quanto uma alta produtividade do ecossistema (ISLAM et al., 2008).

Cabe ressaltar que a BMS é um indicador eficaz de alterações no solo por causas naturais e antropogênicas, antes mesmo da detecção significativa de alterações nos teores do carbono e nitrogênio orgânico total. Sendo assim, a BMS é sugerida como indicador sensível e precoce de mudanças na dinâmica da matéria orgânica do solo e seus efeitos sobre atributos físicos e químicos, resultantes das

diferentes formas de manejo e uso do solo, devem ser avaliados em pesquisas ecológicas (LI, et al., 2004).

2.3.1.3 Quantificação dos genes envolvidos na desnitrificação

A desnitrificação biológica é a principal responsável pela formação de N_2O em solos agrícolas, principalmente quando se utiliza fertilizantes nitrogenados de origem nítrica e em elevadas condições de umidade (ZANATTA, 2009).

De acordo com a Figura 9 tornou-se possível observar uma maior abundância no número de cópias do gene 16S rDNA bacteriano para a condição de manejo com a manutenção da palha (até $7,4 \cdot 10^9$) do que no sistema sem a palha (até $4,0 \cdot 10^8$) no 30º dia, após a aplicação dos fertilizantes nitrogenados.

Figura 9 – Quantificação dos genes 16S rDNA bacteriano em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados: com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR). * Indica diferença significativa entre os manejos com e sem palha para os tratamentos UR e NA ($p < 0,05$)

Levando-se em conta os tratamentos avaliados (TEST, NA e UR) não ocorre diferença estatística entre os tipos de fertilizantes empregados. A única diferença observada foi encontrada no 30º dia de incubação entre os manejos com e sem palha para solos com NA e UR ($p < 0,05$).

O gene 16S rDNA bacteriano representa todas as espécies de procariontes do domínio *Bacteria*, pois ele codifica para a menor subunidade ribossômica. O seu estudo revolucionou o campo da ecologia microbiana e com o seu uso é possível determinar posições filogenéticas das comunidades bacterianas em solos agrícolas (HENTSCHEL et al., 2002).

Os valores encontrados para este gene estão de acordo aos descritos por Henry e colaboradores (2006) que se situam entre 10^8 e 10^9 cópias por grama de solo e por Lammel (2011) trabalhando com solos de pastagem e floresta.

Considerando os genes nitrito redutases (*nirS* e *nirK*), responsáveis pela redução do nitrito à óxido nítrico, foi possível observar uma maior quantidade de cópias em solos com a manutenção da palha, diferindo-se estatisticamente ($p < 0,05$) do manejo sem palha, no 1º e 30º dia de incubação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados (UR e NA), conforme mostrado na Figura 10.

Para o gene *nirS*, o número de cópias atingiu valor máximo de $1,0 \cdot 10^7$ em solos com a manutenção da palha, cerca de 33 vezes superior ao número de cópias de genes sem a palha nas datas onde foi observado diferença significativa. Com relação ao gene *nirK*, o número de cópias atingiu o valor de $1,4 \cdot 10^7$ em solos com palha, cerca de 25 vezes maior do que o encontrando em solos sem a palha.

Figura 10 – Quantificação dos genes *nirS* e *nirK* envolvidos na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados: com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR). * Indica diferença significativa entre os manejos com e sem palha para os tratamentos UR e NA ($p < 0,05$)

A quantificação do gene *nirS* neste trabalho corrobora o encontrado por Dandie e colaboradores (2011), trabalhando com solos de agricultura ribeirinha em incubação, com seu número de cópias variando entre 10^6 e 10^7 . Já para o gene *nirK* valores variando entre 10^8 e 10^9 foram encontrados (DANDIE et al., 2011).

Lammel, 2011 também encontrou valores semelhantes para este gene em seu trabalho com solos agrícolas, com o número de cópias variando entre 10^5 e 10^6 em seus solos agrícolas não incubados.

A quantificação do gene *norB* e *nosZ* está representada na Figura 11.

Figura 11 - Quantificação dos genes *norB* e *nosZ* envolvidos na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de incubação no laboratório. Manejos avaliados: com e sem a manutenção da palha. Tratamentos: testemunha (TEST), nitrato de amônio (NA) e ureia (UR). * Indica diferença significativa entre os manejos com e sem palha para os tratamentos UR e NA ($p < 0,05$)

O gene *norB* apresentou um número de cópias mais baixo do que os demais genes, com valor máximo 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, demonstrando que a presença do fertilizante não foi o fator responsável pelo aumento e manutenção na quantificação deste gene.

Os maiores números de cópias do gene *nosZ* também foram encontrados no manejo com a manutenção da palha, atingindo o valor máximo de $4,3 \cdot 10^7$, cerca de 20 vezes maior que o encontrado nos solos sem a palha no 1º e 30º dias de incubação, apresentando diferença significativa neste período apenas ($p < 0,05$). Para os demais tratamentos, não houve diferenças significativas entre seus valores.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que a presença da palha foi o fator principal que garantiu a maior quantidade de genes envolvidos na desnitrificação. Contudo, para solos incubados, ainda são precárias as informações sobre a quantificação destes genes. Estudos envolvendo emissões de gases estufas e qPCR são muito recentes e com baixo número de pesquisas envolvidas. Todavia, para o agrossistema brasileiro de cana-de-açúcar, ainda não existem trabalhos abrangendo as emissões de N_2O com quantificação de bactérias desnitrificantes. Portanto, a elaboração desta pesquisa e as discussões conduzidas neste estudo buscam unir estes setores (ecologia e microbiologia ambiental), para de alguma forma, contribuir com demais pesquisas deste perfil.

O estudo da quantificação bacteriana via qPCR, relacionado à formação do N_2O pela nitrificação e desnitrificação ganhou forças após o trabalho publicado na *Science* por Canfield et al., em 2011. Até então, as pesquisas se baseavam em apenas alguns genes funcionais como o *nirS* e o *nirK* e relatavam que o óxido nítrico era um gás intermediário durante o ciclo do N, dependendo das condições do solo e da fonte de nitrogênio dos insumos. Neste estudo de Canfield e colaboradores (2011) foi descrito o papel de outro gene funcional denominado óxido nítrico redutase (*norB*) e o seu local de ação, estando diretamente relacionado à formação do N_2O e, sendo este último, um intermediário obrigatório da ação genética desnitrificadora.

O número de cópias do *norB* está abaixo dos demais genes, provavelmente por ser um gene recém descoberto, para o qual os padrões de ciclagem específica

durante a qPCR ainda não foram bem estabelecidos, necessitando mais testes para que atinja um ponto ótimo de amplificação. Neste trabalho, o perfil térmico para este gene foi repetido muitas vezes até chegar a este grau de amplificação.

Lammel (2011) e Dandie et al. (2007) também relataram dificuldades na amplificação do gene *norB*, sendo que após a sua otimização o número de cópias ficou ao redor 10^6 e 10^5 respectivamente para cada trabalho, corroborando o encontrado nesta pesquisa. Estes autores mencionam também que para algumas amostras de solos de pastagem os valores ficaram abaixo do limite de detecção da qPCR, com baixo valor no grau de eficiência do gene ($< 90\%$). Algumas dificuldades na amplificação deste gene podem estar relacionadas ao *primer* que tem o seu desenho baseado em alguns isolados, não representando toda comunidade deste gene no solo (BRACKER, et al. 2003). Boas amplificações deste gene foram encontradas no trabalho de Dandie e colaboradores (2011), com bandas específicas e isoladas curvas de *melting*, porém o número de cópias deste gene está sempre abaixo dos genes *nirS*, *nirK* e *nosZ*.

Fechando a etapa da desnitrificação, ocorre então a formação de N_2 a partir do N_2O , reação codificada pelo gene *nosZ*, que, neste trabalho, apresentou o mesmo número de cópias encontrado no trabalho de Dandie et al. (2011).

A elevada presença de genes envolvidos na desnitrificação indica que estes solos são geradores de N_2O e, mesmo ocorrendo alterações nas condições naturais destes solos para realizar os procedimentos da incubação, a quantidade de bactérias desnitrificantes manteve-se elevada por todo o tempo das análises. Sendo assim, a metodologia da incubação mostrou-se prática e eficaz nas pesquisas envolvendo análises de N_2O e demais estudos microbiológicos.

2.3.2 Solos de cana-de-açúcar em condições naturais (no campo de cultivo)

2.3.2.1 Emissão de N-N₂O

Emissões diárias

As emissões diárias de N-N₂O sob condições de campo e a precipitação pluviométrica estão representadas na Figura 12.

Os valores das emissões diárias de $\text{N-N}_2\text{O}$ em solos sem fertilizante nitrogenado (testemunha) sob as 3 condições de manejo avaliadas em campo (sem a palha, com a manutenção da palha e com a palha artificial) não ultrapassaram $0,05 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e também não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre eles. Estes resultados indicam que a ausência de nitrato de amônio aplicado ao solo não proporcionou fluxo de emissão de $\text{N-N}_2\text{O}$.

Os valores das emissões diárias de $\text{N-N}_2\text{O}$ em solos onde foi aplicado fertilizante nitrogenado (nitrato de amônio) foram maiores sob a condição de manutenção da palha natural e da palha artificial do que sob a condição sem a palha ($p < 0,05$) entre o 3º e 10º dias, chegando a $0,7 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ no 4º dia e $0,6 \text{ mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ no 8º dia. Nos demais dias avaliados, não houve diferença significativa entre as condições de manejo.

Liu et al. (2005) e Schils et al. (2008) também observaram elevados valores nas emissões de N_2O na linha do cultivo de cana-de-açúcar na primeira semana após a adubação nitrogenada nos tratamentos com e sem a palha.

Nos 4º e 8º dias de análises, os fluxos de $\text{N-N}_2\text{O}$ situaram-se entre 0,6 e 0,7 $\text{mg.m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, aproximadamente 14 vezes maior do que as emissões dos demais dias avaliados. Estes fluxos elevados devem-se possivelmente à precipitação pluviométrica (cerca de 50 mm) ocorridas nestes períodos.

Embora também tenha ocorrido um valor pluviométrico elevado entre os dias 17 e 27, não foi possível observar emissões representativas de $\text{N-N}_2\text{O}$. É possível que o alto índice das chuvas no início do experimento tenha eliminado a concentração do fertilizante aplicado através do processo de lixiviação, pois, o efeito do fertilizante no solo é predominante nos 10 primeiros dias após a sua aplicação. Necessita-se, portanto, não apenas considerar a influência da quantidade de chuva no período avaliado, mas também o nivelamento do terreno, que pode facilitar o escoamento e a perda do insumo depositado sobre o solo (WATANABE et al. 2004).

Figura 12 – Emissões diárias de N- N_2O em solos de cana-de-açúcar sob condições de campo. A – Solos sem aplicação de nitrato de amônio. B – Solos com aplicação de nitrato de amônio. Em B estão representados os valores de precipitação pluviométrica

Conforme já mencionado, o objetivo de comparar o efeito da palha artificial com o da palha natural foi verificar se há diferença nas emissões entre estes dois

tratamentos. Supunham-se possíveis emissões de $N-N_2O$ pela palha da cana-de-açúcar, o que poderia interferir na discussão das demais análises moleculares, uma vez que este trabalho avalia as emissões totais de $N-N_2O$ no solo com a presença da palha. Porém, quando se quantificou os genes desnitrificantes via qPCR foi utilizado apenas o solo de cana-de-açúcar excluindo-se a parte aérea ou o produto gerado por ela (palha). Este produto foi analisado posteriormente e neste momento é sabido que não houve presença de bactérias desnitrificantes.

Foi possível observar que os manejos palha natural e artificial, não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas emissões de $N-N_2O$. Sendo assim, pode-se supor que não houve emissão deste gás pela palha da cana-de-açúcar, e, conseqüentemente, que esta palha natural presente no solo não é a principal responsável pelas emissões sob as condições estudadas e sim, o solo adubado mineralmente, associado à forte presença da umidade que afeta diretamente a quantidade de bactérias desnitrificantes.

Passianoto et al. (2003) observaram emissões de $N-N_2O$ após a fertilização, com emissões máximas depois da primeira e alta precipitação. A disponibilidade de água (seja por precipitação pluviométrica ou irrigação) após a adubação nitrogenada resulta em fluxos pontuais elevados de N_2O (CARVALHO et al., 2006), favorecendo a desnitrificação a partir de solos com 80 % dos poros preenchidos por água (DENMEAD et al., 2009).

De certa forma, a magnitude das emissões de $N-N_2O$ do solo para este experimento situa-se dentro da escala estipulada por outros sistemas de manejo deste país, as quais variam entre 10 a 800 $\mu g.m^{-2} h^{-1}$ para tratamentos com manutenção da palha e com a aplicação de diferentes tipos de fertilizantes nitrogenados (GOMES, 2006; GIACOMINI et al., 2006; CERRI et al., 2009; JANTÁLIA et al., 2008).

Emissões acumuladas

Sob as condições de manejo com e sem a permanência da palha e com adição da palha artificial em solos sem a aplicação de nitrato de amônio, as emissões acumuladas ficaram próximas a 1 $mg.m^{-2} h^{-1}$. Já para os solos com a aplicação do fertilizante chegaram a 20 $mg.m^{-2} h^{-1}$ (Figura 13).

Figura 13 – Emissões acumuladas de N-N₂O em solos de cana-de-açúcar sob condições de campo. A – Solos sem aplicação de nitrato de amônio. B – Solos com aplicação de nitrato de amônio

As equações que descrevem as emissões acumuladas para condições de manejo com palha, sem palha e palha artificial para os tratamentos de testemunha e nitrato de amônio estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Equação que descreve as emissões acumuladas de N-N₂O para os tratamentos e condições de manejo avaliadas em campo (p<0,05)

Manejo	Testemunha	Nitrato de amônio
Sem palha	$y = 0,008x + 0,0251$ $R^2 = 0,9569$	$y = 0,1581x - 0,7206$ $R^2 = 0,967$
Com palha	$y = 0,0446x + 0,0187$ $R^2 = 0,9967$	$y = 0,7392x - 3,7635$ $R^2 = 0,9506$
Palha artificial	$y = 0,042x - 0,0166$ $R^2 = 0,999$	$y = 0,6582x - 3,4892$ $R^2 = 0,9433$

Carmo e colaboradores (2012) demonstraram que o fluxo acumulado de N-N₂O chegou a 10 mg.m⁻².h⁻¹ para solos de cana-de-açúcar sob a condição de manutenção da palha e com a aplicação de vinhaça. Portanto, a vinhaça pode representar um substituto ideal para o nitrato de amônio ou a ureia, conforme já vem sendo feito na cultura de cana-de-açúcar no Brasil.

A explicação proposta por este trabalho para as elevadas emissões de N-N₂O em solo fertilizado baseia-se na presença da umidade relativa à precipitação, pois a adição de resíduos vegetais à superfície do solo conserva a umidade e garante maior atividade microbológica. Tal adição aumenta sensivelmente a atividade biológica na superfície do solo, consumindo o O₂ disponível, criando sítios de anaerobiose, onde ocorre produção de N₂O por desnitrificação bacteriana. Esta situação também foi demonstrada no trabalho de Baggs et al. (2006). Carmo et al. (2005) e Ruser et al. (2006) também observaram maiores emissões de N₂O em solos ricos em umidade e com alta concentração de nitrato, relatando que a maior a quantidade de poros no solo preenchidos por água está correlacionada positivamente ao C disponível e ao potencial de mineralização, indicando que a umidade estimula a atividade microbiana e consequentemente às reações de desnitrificação. Sendo assim, quanto maior a umidade, maior a quantidade de N₂O produzido.

Emissões médias de N-N₂O e fator de emissão

Os valores médios das emissões de N-N₂O estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Emissões médias de N-N₂O e erro (n=5) para os tratamentos testemunha e nitrato de amônio sob as condições avaliadas no campo

Manejo	Tratamento	Emissões médias de N-N ₂ O (mg.m ⁻² h ⁻¹)
Sem palha	TEST	0,05±0,002 a
	NA (120 kg ha ⁻¹)	0,1±0,02 b
Com palha	TEST	0,06±0,002 a
	NA (120 kg ha ⁻¹)	0,5±0,01c
Palha artificial	TEST	0,06±0,002 a
	NA (120 kg ha ⁻¹)	0,4±0,02c

Letras comparam as médias entre os sistemas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Com relação ao tratamento TEST, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores médios das emissões de N-N₂O. Já para o tratamento NA os valores de N-N₂O não diferiram entre os manejos com palha e palha artificial, demonstrando que o fluxo de N-N₂O está diretamente relacionado às condições físico-químicas do solo e que palha natural pode estar representando apenas um fator de manutenção da umidade relativa à precipitação, favorecendo elevadas emissões de N₂O, provavelmente pela intensificada atividade de bactérias desnitrificantes.

A partir das emissões médias foram calculados os fatores de emissão de N-N₂O em função do tratamento avaliado. O fator de emissão neste trabalho se situou próximo de 0,3 % para o NA no manejo sem palha. Para o manejo com palha e palha artificial este fator chegou respectivamente a 0,7 % e 0,58 %.

Assim como nas condições de incubação do solo, os valores encontrados neste estudo, realizado no campo, não estão além dos limites de incerteza do padrão estabelecido no IPCC (2012) - 0,03 a 3 %.

Cabe às demais pesquisas de caráter tecnológico e ambiental buscar melhores soluções para atingir as metas estabelecidas pelo IPCC (2012) em tentar reduzir em até 60 % as emissões de N₂O manipulando sistemas de manejo do solo de todo sistema agrícola brasileiro, condicionando assim, melhores produtividades aliadas a um aporte adequado de insumos agrícolas.

2.3.2.2 Comparação das estimativas das emissões de N-N₂O sob as condições de laboratório e de campo

Embora os picos diários de emissão de N-N₂O apresentem-se em períodos diferentes, pelos resultados obtidos foi possível perceber uma mesma tendência nos valores das emissões nos tratamentos (TEST e NA) e nas condições de manejos (com e sem palha) avaliadas no laboratório pela metodologia da incubação e no campo de cultivo de cana-de-açúcar. Na situação de laboratório, os picos máximos situaram-se próximos do 14º dia após a aplicação dos fertilizantes e, no campo, no período de maior índice de chuva.

Cabe ressaltar que, para realizar os experimentos de incubação, foi necessário revolver o solo e peneirá-lo, alterando alguma de suas principais propriedades, como também sua porosidade e capacidade de retenção de água, modificando completamente a dinâmica de sua matéria orgânica e consequentemente favorecendo a sobrevivência de grupos específicos de micro-organismos.

Para conduzir as análises de N₂O nos experimentos de campo de cultivo de cana-de-açúcar não são feitas demasiadas alterações nas condições naturais do solo como nos experimentos de incubação como o revolvimento do solo. Contudo, as alterações climáticas no local, como precipitação e temperatura do solo, aliadas às maiores quantidades de solo concentrado no interior das câmaras podem também acabar interferindo na naturalidade dos resultados da pesquisa.

Enfim, apesar das diferenças existentes entre as duas situações estudadas (laboratório e campo) as estimativas das emissões de N-N₂O ficaram muito próximas nas análises diárias para o fertilizante estudado e para os sistemas de manejo avaliados (com e sem palha), indicando que a metodologia da incubação mostrou-se prática, eficaz e com resultados muito corroborados por outras pesquisas.

2.3.2.3 C e N da biomassa microbiana e N-inorgânico no solo

C e N microbiano no solo

Embora a BMS represente uma pequena porcentagem da matéria orgânica no solo, tanto o C-microbiano quanto o N-microbiano responderam positivamente aos tratamentos avaliados neste trabalho, conforme indicado na Figura 14.

As diferenças significativas encontradas para o C-microbiano estão no 4º e 8º dias de análises (mesmo período de elevada emissão de $\text{N-N}_2\text{O}$), para solos com aplicação de fertilizante (NA) e com a manutenção da palha natural e da artificial em relação aos demais tratamentos. Estas duas últimas condições de manejo não se diferiram entre si em nenhum período ($p < 0,05$).

O valor máximo de C-microbiano está no tratamento com palha-NA, 4º dia de análise, atingindo 721 kg. ha^{-1} . Para o N-microbiano, chegou a atingir 195 kg. ha^{-1} , também no mesmo tratamento e período considerado, após a aplicação do fertilizante nitrato de amônio.

Com relação ao N-microbiano, as diferenças significativas seguem o mesmo padrão do C-microbiano, diferenciando o tratamento com palha natural e artificial dos demais, porém não apenas no 4º, 8º dias, mas também no 15º.

A relação C:N da BMS nestes períodos de maiores concentrações (4º e 8º dias) para o tratamento com palha-NA foi de 3,7 e 3,4 respectivamente. Para as testemunhas, este valor ficou próximo a 9.

A biomassa microbiana pode imobilizar alta quantidade de N mineral oriunda do solo e do N aplicado, especialmente no sistema semeadura direto e para situações de manejo onde são preservados os resíduos culturais (VARGAS et al., 2005). Sob estas situações de elevado aporte de resíduos, como o da cana-de-açúcar, a biomassa microbiana passa a atuar mais como agente de mineralização do N orgânico do solo do que como fonte de N potencialmente mineralizável, justificando maiores valores de C e N-microbiano encontrados nos tratamentos com a manutenção da palha.

Em suma, considerando os manejos com e sem palha e os tratamentos TEST e NA, os valores da BMS no campo de cultivo de cana-de-açúcar estão próximos aos encontrados no solo sob a condição de incubação em laboratório, indicando mais uma vez a proximidade de valores entre estas diferentes metodologias.

As condições de aeração, pH e disponibilidade de minerais e raízes no solo e, principalmente o efeito da umidade e temperatura, influenciam quantitativamente no desenvolvimento microbiano, principalmente no de bactérias e fungos.

Figura 14 – BMS na camada 0-10 cm nas 5 datas avaliadas. A – C-microbiano; B – N-microbiano. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizante); NA – Nitrato de amônio utilizado como fertilizante. * Indica diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$)

Costa e colaboradores (2006) trabalhando com plantio convencional e direto afirmam que a manutenção dos resíduos e consequentemente da umidade tende a elevar as concentrações microbianas. Com isso, a BMA tende a responder mais rapidamente a alta quantidade de água no solo do que simplesmente aos atributos edáficos do solo como quantidade de matéria orgânica decomponível.

Galdos (2007) trabalhando com solos de cana-de-açúcar encontrou valores de C-microbiano mais elevado nas camadas superiores do solo, onde havia a aplicação de fertilizantes nitrogenados e os valores corroboram os obtidos nos tratamentos testemunhas deste trabalho.

Venzke e colaboradores (2008) observaram que em solos sob o sistema de plantio direto também continha alta concentração de C e N microbiano principalmente em período de muita precipitação, pressupondo-se que sob as condições de elevada umidade, o desenvolvimento microbiano é favorecido nas camadas superficiais do solo.

Portanto, aplica-se o raciocínio de que o aporte de fertilizantes nitrogenados, a manutenção da palha e a consequente retenção da umidade nestes solos são os principais responsáveis pelos altos valores de C e N-microbianos apresentados neste trabalho.

N-mineral no solo

As formas inorgânicas de N (NH_4^+ e NO_3^-) são as únicas absorvíveis por vegetais e micro-organismos. Porém em excesso no solo, este nitrato pode favorecer reações de desnitrificação e consequentemente as emissões de N_2O . A Figura 15 mostra os valores de N-inorgânico nos solos de cana-de-açúcar nos mesmos tratamentos e condições de manejos avaliados na BMS.

Figura 15 – N-inorgânico no solo da camada 0-10 cm nas 5 datas avaliadas. TEST – Testemunha (sem aplicação de fertilizante); NA – Nitrato de amônio utilizado como fertilizante. * Indica diferença significativa entre tratamentos ($p < 0,05$)

Os valores encontrados nos solos com a aplicação de nitrato (NA) diferem estatisticamente dos demais tratamentos nos dias 4 e 8 ($p < 0,05$). Nestas situações o valor N inorgânico chegou a 9 kg ha^{-1} . O tratamento com palha também difere dos demais nos 5 dias avaliados chegando a $7,6 \text{ kg ha}^{-1}$. Nos demais tratamentos sem a aplicação de NA, os valores variaram entre $3,7$ e 6 kg ha^{-1} .

Provavelmente os maiores valores de N-inorgânico devem-se ao aporte do fertilizante nitrogenado e ao período de elevada precipitação que ocorreu entre os dias 4 e 8. O aporte de palha provavelmente também tenha contribuído para esta elevação do N-inorgânico, mas, de acordo com os resultados, não foi o principal fator.

Siqueira Neto (2006) trabalhando com solos do cerrado também observou valores elevados para o N-inorgânico no período de chuva, diminuindo consideravelmente no período de seca.

Dentro das perspectivas dos sistemas de plantio utilizados no Brasil, os valores de N-inorgânico provavelmente são menores no plantio convencional, pelo próprio revolvimento do solo que acontece antes da implementação de uma cultura.

2.3.2.4 Quantificação dos genes envolvidos na desnitrificação

A desnitrificação é um processo microbiano facultativo que resulta na produção de nitrogênio atmosférico a partir da redução do nitrato, nitrito, óxido nítrico e do óxido nitroso, sucessivamente (TIEDJE, 1988).

Embora a extração do DNA da palha tenha sido bem sucedida não foi possível quantificar os genes responsáveis pela desnitrificação (*nirS*, *nirK* e *norB*) pela técnica qPCR.

Para as amostras de solo, tanto a extração quanto a quantificação dos genes forneceram resultados satisfatórios.

A Figura 16 mostra a quantidade total de bactérias em solos de cana-de-açúcar com e sem a aplicação de fertilizantes nitrogenados. O valor máximo do gene 16S rDNA bacteriano encontrado foi de $5 \cdot 10^8$ para solos com manutenção da cobertura vegetal e aplicação de NA.

Figura 16 – Quantificação do gene 16S rDNA em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Aplicação de nitrato de amônio. * Indica diferença estatística entre os manejos avaliados ($p < 0,05$)

Para os solos sem a aplicação de NA (Figura 16A), a única condição de manejo que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em seu valor foi o de palha artificial no 8º dia de coleta e análise dos fluxos N_2O . Neste período, a quantidade dos genes bacterianos encontrados (1.10^7) foi menor em relação às demais condições avaliadas neste estudo. Já para solos com aplicação de NA (Figura 16B), a quantidade de bactérias encontradas não diferiu estatisticamente nos manejos avaliados ($p < 0,05$).

De certa forma, a adição de nitrato ao solo não alterou a quantidade total de bactérias e a utilização da palha artificial parece não influenciar nestes valores.

Diante das condições específicas de desnitrificação, a quantificação do gene *nirS* está representada na Figura 17 e do gene *nirK* na Figura 18.

Figura 17 – Quantificação do gene *nirS* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio. * Indica diferença estatística entre os manejos ($p < 0,05$)

Os valores obtidos para os gene *nirS* e *nirK*, responsáveis pela redução de NO_2^- a NO , estão próximos a 10^7 . Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são observadas

na quantidade de *nirS* no 8º dia, para o sistema de palha artificial no tratamento testemunha (Figura 17A). Neste manejo (palha artificial), a quantidade de *nirS* foi 9 vezes menor do que o encontrado na situação de palha natural.

No tratamento testemunha (Figura 18A) a quantidade de *nirK* foi cerca de 5 vezes menor para o sistema sem a palha em relação aos demais manejos no 4º dia de análise. No tratamento NA (Figura 18B) os valores de *nirK* são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) na condição com palha artificial, no 15º dia de análise.

Figura 18 – Quantificação do gene *nirK* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio. * Indica diferença estatística entre os manejos ($p < 0,05$)

Para o gene *norB*, responsável pela redução de NO à N₂O as quantificações estão mostradas na Figura 19.

Figura 19 – Quantificação do gene *norB* envolvido na desnitrificação biológica para solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio. * Indica diferença estatística entre os manejos ($p < 0,05$)

Diferenças significativas são observadas tanto no tratamento TEST (Figura 19A), quanto no NA (Figura 19B). Em TEST, a quantidade deste gene foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos manejos com palha e palha artificial (cerca de 9 vezes maior do que no sistema sem a palha), nos dias 4, 8 e 15, indicando que o aporte de resíduo (natural ou não) sobre o solo de cana-de-açúcar, favorece uma

maior quantificação do gene *norB*. Em NA, a presença deste gene é significativamente mais elevada (16 vezes maior do que no sistema sem a palha) nos manejos com palha e palha artificial, no mesmo período e sem diferenças significativas no 1º e 30º dias de análises. Em relação aos tratamentos TEST e NA, a quantidade total de *norB* não se diferenciou, apresentando valores máximos de 8.10^5 , indicando que a aplicação de nitrato ao solo não aumenta nem diminui a quantidade deste gene.

O gene que participa da redução de N_2O a N_2 (*nosZ*) apresentou quantidades máximas de 2.10^7 no 1º dia em solos com aplicação de nitrato, conforme mostrado na Figura 20. Diferença estatística ($p < 0,05$) foi observada apenas no 8º dia para o tratamento TEST (Figura 20A) entre palha artificial e os demais manejos (aproximadamente 13 vezes maior).

Figura 20 – Quantificação do gene *nosZ* envolvido na desnitrificação biológica em solos de cana-de-açúcar em condições de campo. Manejos avaliados: sem palha, palha natural e palha artificial. A – Testemunha. B – Nitrato de amônio. * Indica diferença estatística entre os manejos ($p < 0,05$)

Fertilizantes nítricos como o nitrato de amônio contribuem para a emissão de N_2O do solo por meio do processo de desnitrificação, enquanto formas amoniacais e amídicas, presentes na ureia, podem participar pela nitrificação e desnitrificação (ZANATTA, 2009). Portanto, como nestes solos foi utilizado nitrato como insumo, justifica-se o uso de genes funcionais de bactérias desnitrificantes, desconsiderando a nitrificação como fonte de N_2O .

Todos os genes apresentaram boa amplificação pelo qPCR. Tanto para a condição de campo, quanto para incubação em laboratório, a quantidade de

bactérias desnitrificantes apresentou similaridade, demonstrando mais uma vez a eficácia da metodologia da incubação.

Brankatschk e colaboradores (2011) conseguiram boas amplificações para os genes *nirS*, *nirK* e *nosZ* até mesmo em solos pertencentes ao ecossistema glacial das geleiras do território suíço, demonstrando que a desnitrificação pode ocorrer sob diversas situações edafoclimáticas e atribuíram as elevadas quantidade destes genes à umidade do solo proveniente do derretimento do gelo.

Os menores valores encontrados na quantificação destes genes (10^5 na ordem de grandeza) são encontrados para o *norB*. Já foram relatadas por Lammel, (2011) algumas dificuldades na amplificação deste gene. No caso deste trabalho, várias repetições foram feitas, alterando as condições de amplificação, de forma a aperfeiçoar os resultados e obter valores próximos aos obtidos por Dandie et al. (2011) de 10^5 e 10^6 na ordem de grandeza. Os demais genes não apresentaram nenhum grau de dificuldade na amplificação.

Trabalhando com microalgas para produção de biocombustíveis, Fagerstone et al. (2011) demonstraram que a redução do nitrato e a formação de N_2O por estes organismos decaía quase 80 % após a utilização de um composto antibiótico que inibia o desenvolvimento de espécies de bactérias que cotinham o gene *norB*, o responsável direto da produção de N_2O a partir de NO . Além disso, em seus experimentos, estes autores demonstraram que estas microalgas produziam elevadas concentrações de óxido nitroso em condições anóxicas, na presença do nitrato via fertilização nitrogenada (nitrato de amônio), reforçando a teoria da produção de gás estufa pela desnitrificação biológica.

Miller e colaboradores, (2008) confirmaram através de seus trabalhos que a adição de carbono orgânico (glicose) nos solos não aumentou a quantidade dos genes *nosZ* (10^7 na ordem de grandeza), mas aumentou a quantidade de *norB* (10^5 na ordem de grandeza). Para estes autores, os principais fatores que contribuem com o aumento de *norB* e consequentemente elevadas emissões de N_2O são a umidade e uma fonte de carbono facilmente decomponível.

No que se refere à condição de manejo, foi possível demonstrar numericamente que a manutenção da palha foi responsável por maiores valores dos genes envolvidos na desnitrificação. No entanto, a utilização paralela de uma palha artificial revelou que este número não se altera significativamente e, assim como para as análises de N_2O , pode-se afirmar que a quantidade de genes envolvidos na

desnitrificação possa estar mais diretamente relacionada à manutenção da umidade nestes solos de cana-de-açúcar pela presença da palha no local, o que contribui para a atividade anaeróbica de bactérias desnitrificantes. Cabe ressaltar que na época da coleta e análise dos solos, a umidade devido à precipitação foi elevada, conforme mostrado no gráfico de emissões de N_2O .

Com relação ao fertilizante utilizado na cultura de cana-de-açúcar (nitrato de amônio) nenhum gene sofreu alteração em quantidade neste tratamento. De acordo com Morales e colaboradores (2010) é necessário um estudo mais complexo envolvendo expressão gênica para propor uma relação entre as emissões de gases estufa com determinadas cepas. Trabalhando com solos agrícolas com cobertura vegetal e, utilizando qPCR paralelo às análises de gases estufa, estes autores encontraram valores de 4.10^4 e 8.10^3 , respectivamente para os genes *nirS* e *nosZ*, muito inferior ao encontrado neste estudo. Ainda em seus trabalhos foi sugerido que o gene *nirS* tem relação direta na produção de N_2O , porém de acordo com um levantamento bibliográfico, eles mencionam que a grande maioria das desnitrificantes apresentam o gene *nirK* ao invés da *nirS*. Para os solos agrícolas de cana-de-açúcar deste estudo, a quantidade de *nirS* e *nirK* estão próximas, a ponto de não diferirem estatisticamente ($p < 0,05$), reforçando a existência de genes envolvidos na produção de N_2O pela desnitrificação biológica.

Ao estudar a expressão gênica é possível afirmar se determinados organismos estão exercendo alguma atividade funcional específica. Sendo assim, a técnica do qPCR utilizada neste trabalho, amplificando genes funcionais, indica apenas a presença numérica dos micro-organismos desnitrificantes, mas não a execução de sua atividade, ou seja, pode-se dizer que a presença da bactéria é apenas um indício de que esteja ocorrendo a desnitrificação e consequentemente a formação de N_2O .

2.3.2.5 Influência da queima da palha de cana-de-açúcar na desnitrificação

Para determinar se a queima da palha de cana-de-açúcar exerce alguma influência na quantidade de bactérias desnitrificantes, ou, se esta quantidade foi favorecida pela presença da palha, o gene *nirS* foi quantificado e os resultados estão mostrados na Figura 21.

A escolha pelo gene *nirS* para realização deste experimento foi motivada pela facilidade obtida na amplificação deste gene durante as análises dos solos de cana-de-açúcar sob as condições de laboratório e de campo.

A quantidade de genes *nirS* foi significativamente maior ($p < 0,05$) no tratamento com palha (sem queima) em relação aos demais, com valores chegando a $3 \cdot 10^6$.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores da quantificação do gene *nirS* obtidos no tratamento com queima e sem queima (onde a palha foi removida da linha de cultivo). No tratamento com palha, a quantidade deste gene foi 27 vezes superior ao encontrado nos tratamentos com queima e com a palha removida.

Figura 21 – Solos de cana-de-açúcar ausentes de fertilizantes nitrogenados sob três condições de manejo avaliadas. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Estes resultados indicaram que a queima da palha não causou a diminuição do gene *nirS*. A retirada da palha em solos sem queima ocasionou a diminuição numérica destes genes, apresentando valor de quantificação de 10^5 na ordem de grandeza, muito próximo ao encontrado no sistema com queima.

Ainda são questionáveis os danos que a queima da palha traz à microbiota do solo. A rapidez com que os micro-organismos são repostos em um determinado ambiente tem gerado discussões no que se refere à sua resiliência (CANÇADO et al., 2006).

Morais, (2008) estudando bactérias em solos de cana-de-açúcar demonstrou através de técnicas de PCR-DGGE, que a queima não alterou o perfil da comunidade destes micro-organismos. Jackson et al. (2003) atribuem as possíveis alterações na dinâmica da MOS e no perfil microbiano mais ao revolvimento do solo durante a instalação da cultura do que aos processos de queima da palha. Além disso, as alterações ocorridas nas estruturas das comunidades microbianas no solo devido algum estresse são temporárias.

A queima da palha da cana-de-açúcar é proibida, contudo em alguns locais da região ela ainda acontece. Subentende-se que a queima da palha visa facilitar e baratear a colheita, porém são inquestionáveis os malefícios que a fumaça e a fuligem trazem ao sistema respiratório humano.

A presença da palha deixada no campo após a colheita mecanizada da cana implica em alguns benefícios ao solo, como, o aumento da qualidade do solo, da infiltração de água e da atividade microbiana, protege a superfície do solo contra a erosão causada pela chuva e vento. Porém, também são verificados alguns problemas com a presença desta palha no solo, como o risco de incêndio após a colheita mecanizada e aumento da população de pragas que abrigam e se multiplicam (MANECHINI et al., 2005).

Enfim, necessita-se de estudos mais aprofundados para avaliar os efeitos que a presença ou ausência da palha trazem ao solo, aos micro-organismos e à ciclagem de componentes orgânicos e inorgânicos, levando-se em conta os possíveis problemas ambientais oriundos destes tipos de manejos, como a geração de GEE e demais poluentes, buscando obter um balanço positivo para os setores econômicos, sociais e ecológicos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível concluir que a utilização de fertilizantes nitrogenados nos solos de cana-de-açúcar com a presença da palha foi responsável por maior emissão de óxido nitroso. O fluxo deste gás torna-se evidente na segunda semana após a aplicação do nitrato de amônio e da ureia em solos incubados em laboratório, porém no campo de cultivo, este fluxo foi condicionado pela umidade relativa à precipitação.

O sistema de manejo de cana-de-açúcar por colheita mecanizada (com a permanência da palha) afetou diretamente a quantidade dos genes envolvidos na desnitrificação, aumentando-os provavelmente em função da elevada umidade no solo e, este aumento não foi impulsionado pela presença dos insumos nitrogenados aplicados no plantio. Além disso, a presença de uma palha artificial nos solos de cana-de-açúcar provou que as emissões de óxido nitroso e a quantidade de bactérias permaneciam indiferentes em relação ao sistema agrícola que utilizava a palha natural do plantio.

A BMS e o N mineral mostraram-se sensíveis ao uso dos insumos agrícolas e pela presença da palha da cultura de cana-de-açúcar.

A qPCR é uma metodologia muito eficaz nas análises quantitativas de DNA bacteriano, porém, necessita-se aprimorar o conhecimento nesta área microbiológica, utilizando outras técnicas biomoleculares envolvendo a expressão de genes funcionais relacionados com a desnitrificação e também na nitrificação, para poder estabelecer corretamente suas relações com as emissões de gases estufa.

Os fatores de emissão do fertilizante nitrogenado utilizado no campo de cultivo não estão além dos limites de incerteza do padrão estabelecido pelo IPCC, chegando a 0,7 % para solos com palha e 0,3 % nos solos sem palha.

A queima da palha de cana-de-açúcar não foi a principal responsável pela diminuição na quantidade de genes bacterianos envolvidos na desnitrificação e sim, a retirada da palha do solo.

No Brasil, ainda é precário o número de trabalhos que enfocam principalmente os genes envolvidos na desnitrificação biológica em conjunto com fluxos de N_2O . Emissões de gases estufas e a genética microbiana ainda são estudadas separadamente, necessitando ampliar os investimentos nas pesquisas

nestes setores, com o propósito de conferir a união entre as áreas agrárias biomoleculares.

Enfim, é fundamental averiguar as melhores condições do uso da terra e o atributo biológico efetuado pelos micro-organismos que nela existem, proporcionando um tratamento adequado aos resíduos culturais, de modo que a adubação escolhida responda positivamente aos requisitos primordiais à saúde do vegetal e do clima, enriquecendo não apenas a economia, mas também a educação ecológica do país.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO FILHO, J.; MATSUOKA, S.; SPERANDIO, M.L.; RODRIGUES, R.C.D.; MARCHETTI, L.L. Resíduo da colheita mecanizada de cana crua. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v.7, p.23-25, 1993.
- AITA, C.; BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; GONÇALVES, C.N.; DA ROS, C.O.C. Plantas de cobertura de solo como fontes de nitrogênio ao milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 5 p.1165-1172, 2001.
- AVRAHAMI, S.; CONRAD, R.; BRAKER, G. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.8, p. 5685– 5692, 2003.
- BAGGS, E.M.; CHEBII, J.; NDUFA, J.K. A short-term investigation of trace gas emissions following tillage and no-tillage of agroforestry residues in western Kenya. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 9, p. 69-76, 2006.
- BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.18, p. 574-581, 1995.
- BOUWMAN, A.F.; BOUWMAN, L.J.M.; BATJES, N.H. Modeling global annual and N₂O emissions from fertilized fields. **Global Biogeochemical Cycles**, Malden, v. 16, p. 1080–1088, 1998.
- BOWDEN, R.D.; STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soil in the northeastern United State. **Journal of Geophysical Research**, Boston, v. 95, p. 13997-14005, 1990.
- BRAKER, G.; TIEDJE, J. M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3476–3483, 2003.
- BRANKATSCHK, R.; TOWE, S.; KLEINEIDAM, K.; SCHLOTTER, M.; ZEYER, J. Abundances and potential activities of nitrogen cycling microbial communities along a chronosequence of a glacier forefield. **The ISME Journal**, New York, v. 5, p. 1025–1037, 2011.
- BUNEMANN, E.K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 44, p. 379-406, 2006.
- CANÇADO, J.E.D.; SALDIVA, P.H.N.; PEREIRA, L.A.A.; LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; ARBEX, M.A.; ZANOBETTI, A.; BRAGA, A.L.F. The impact of sugarcane–burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. **Environmental Health Perspectives**, Michigan, v. 114, p. 725-729, 2006.

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

CANTARELLA, H. Adubação nitrogenada em sistema de cana crua. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.16, p.21-22, 1998.

CANTARELLA, H. TRIVELIN, P.C.O.; CONTIN, T.L.M.; DIAS, F.L.F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R.B.; QUAGGIO, J.A. Ammonia volatilization from urease inhibitor-treated applied to sugarcane trash blankets. **Scientia agricola**, Piracicaba v.65, p. 397-401, 2008.

CARMO, J.B.; ANDRADE, C.A.; CERRI, C.C.; PICCOLO, M.C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N_2O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 735-746, 2005.

CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUSA NETO; PITOMBO, L.M.; DUARTE-NETO, P., VARGAS, V.; ANDRADE, C. GAVA, J.C.; ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; MARTINELLI, L. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **GCB Bioenergy**, London, v. 5, p. 267–280, 2012.

CARVALHO, A. M.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KOZOVITS, A.R.; MIRANDA, L. N.; VIVALDI, L. J.; SOUZA, D.M. Emissões de NO e N_2O associadas à aplicação de ureia sob plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p.679-685, 2006.

CASCIOTTI, K. L.; WARD, B. Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 52 p. 205-212, 2005.

CASSINI, S.T. **Ciclo do nitrogênio**. Livro-Texto. Universidade Federal do Espírito Santo, 2005. 132p.

CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; GALDOS, M.V.; CERRI, C.E.P.; FEIGL, B.J.; BERNOUX, M. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, p.831-843, 2009.

CIARLO, E.; CONTI, M.; BARTOLONI, N.; RUBIO, G. 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**, Berlin, v. 44, p. 991-995, 2008.

CLAESSON, M.J.; WANG, Q.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; ROSS, R.P.; O'TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p. 1-13, 2010.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKAI, E.A. Minireview: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p. 4951–4959, 2005.

COSTA CC; OLIVEIRA CD; SILVA CJ; TIMOSSI PC; LEITE IC. Crescimento, produtividade e qualidade de raízes de rabanete cultivadas sob diferentes fontes e doses de adubos orgânicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, p.118-122, 2006.

DANDIE, C. E.; WERTZ, S.; LECLAIR, L.; GOYER, C., BURTON, D.; PATTEN, C. BERNIE J.; ZEBARTH, B.; TREVORS. J. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p.69-82, 2011.

DANDIE, C.E.; BURTON, D.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T.; GOYER C. Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, p. 128-138, 2007.

DANDIE, C.E.; MILLER, M.N.; BURTON, D.L.; ZEBARTH, B.J.; TREVORS, J.T.; GOYER, C. Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 4250-4258, 2007.

DENMEAD, O.T.; MACDONALD, B.C.T.; BRYANT, G.; NAYLOR, T.; WILSON, S.; GRIFFITH, D.W.T.; WANG, W.J.; SALTER, B.; WHITE, I.; MOODY, P.; Emissions of methane and nitrous oxide from Australian sugarcane soils. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 150, p. 748–756, 2009.

FAGERSTONE, K.D.; QUINN, J.C.; BRADLEY, T.H.; DE LONG, S.K.; MARCHESE, A.J. Quantitative Measurement of Direct Nitrous Oxide Emissions from Microalgae Cultivation, **Environmental Science and Technology**, Washington DC, v. 45, p. 9449-9456, 2011.

FEIGL, B.J.; MELILLO, J.M.; CERRI, C.C. Changes in the origin and quality of soil organic matter after pasture introduction in Rondônia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, p. 21-29, 1995.

GALDOS, M.V. **Dinâmica do carbono no agrossistema cana de açúcar**. 2007. 101p. Tese de (Doutorado em Ciência do Solo) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GIACOMINI, S.J.; JANTALIA, C.P.; AITA, C., URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. Emissão de óxido nitroso com a aplicação de dejetos líquidos de suínos em solo sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v. 41, p. 1653–1661, 2006.

GLOCKNER, A.B.; JÜNGST, A.; ZUMFT, W.G. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (*nirS*) of *Pseudomonas stutzeri*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 160, n.1, p. 18-26, 1993.

GOMES, J. **Emissão de gases do efeito estufa e mitigação do potencial de aquecimento global por sistemas conservacionistas de manejo do solo**. 2006. 126p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

HALLIN, S.; LINDGREN, P.-E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1652–1657, 1999.

HENDRIKS, J.; OUBRIE, A.; CASTRESANA, J.; URBANI, A.; GEMEINHARDT, S.; SARASTE, M. Nitric oxide reductases in bacteria. **Bioenergetics**, New York, v. 1459, p. 266–273, 2000.

HENRY, S.; BRU, D. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of *16S rRNA*, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.8, p. 5181-5189, 2006.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore v. 68, p.4431-4440, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Relatório: **Consumo e produção de cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 16 out. 2011.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE-IPCC. **Technical summary on Climate change**. Cambridge, 2012. 398p.

_____, Technical summary. **Contributions of Working Group I. of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 398p.

ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L.J.; LARSEN, O.; BIRKELAND, N. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 105, p. 300-304, 2008.

JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STEENWERTH, K.L.; SCOW, K.M.; ROLSTON, D.E. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, p. 305-317, 2003.

JANTALIA, C.P.; SANTOS, H.P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 82, p. 161-173, 2008.

KLOOS, K.; MERGEL, A.; ROSCH, C.; BOTHE, H. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Oxford, v. 28, p. 991–998, 2001.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Boston, v. 27, p. 95-125, 2006.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 43-84, 2005.

LAMMEL, D.R. **Soil microbiota related to the carbon, nitrogen and greenhouse gas cycles across different land uses in Southwestern Amazonia**. 2011. 151p. Tese de (Doutorado na area de Biogeoquímica) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo Piracicaba, 2011.

LARA CABEZAS, W.A.R.; SOUZA, M.A.S. Volatilização de amônia, lixiviação de nitrogênio e produtividade de milho em resposta à aplicação de misturas de ureia com sulfato de amônio ou com gesso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2331-2342, 2008.

LI, Q.; ALLEN, H.L.; WOLLUM II, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.3, p. 571-579, 2004.

LIU, X.J.; MOSIER, A.R.; HALVORSON, A.D.; ZHANG, F.S. Tillage and nitrogen application effects on nitrous and nitric oxide emissions from irrigated fields. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 276, p. 235-249, 2005.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; BERETTA, M.J.G.; LARANJEIRA, F.F.; CARVALHO, S.A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja ‘pêra’ com clorose variegada de citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22 , p. 30 - 33, 1997.

MANECHINI, C.; JUNIOR RICCI, A.; DONZELLI, J.L. Benefits and problems of trash left in the field. In: SULEIMAN, J.H.; LEAL, M.R.L.V.; MACEDO I.A. **Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash**, Programa das Nações Unidas para Desenvolvimento (PNUD) – Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, 2005. 217p. (Série Caminhos para Sustentabilidade 1).

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 425- 433, 2003.

MICHOTÉY, V.; MEJEAN, V.; BONIN, P. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1564–1571, 2000.

MILLER, M.N.; ZEBARTH, B.J.; DANDIE, C.E.; BURTON, D.L.; GOYERA, C.; TREVORS, J.T. Crop residue influence on denitrification, N₂O emissions and denitrifier community abundance in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.40, p. 2553–2562, 2008.

MORAIS, M. **Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. 2008. 88p. Tese de (Doutorado em Ciência do Solo) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Ciência do Solo- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MORALES, S.; COSART, T.; HOLBEN, W. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 799–808, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

MURRAY, H.G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p.4321-4325, 1980.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAUJO, W.L.; GOLDMAN, J.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Minnesota, v. 92, p. 1048-1054, 2002.

OLIVEIRA, R.A. de; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; IDO, O.T.; BESPALHOKFILHO, J.C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; SILVA, D.K.T. Área foliar de três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, p. 71-76, 2007.

O'NEILL, P. **Environmental Chemistry**, 2nd ed. London: Bookman, 1993. v.1 342p.

PASSIANOTO, C.C.; AHRENS, T.; FEIGL, B.J.; STEUDLER, P.A.; CARMO, J.B. ; MELILLO, J.M. Emissions of CO₂, N₂O, and NO in conventional and no-till management practices in Rondônia, Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, p. 200-208, 2003.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. **Current Opinion in Microbiology**, Kansas City, v. 8, p.234-239, 2005.

RUSER, R.; FLESSA, H.; RUSSOW, R.; SCHMIDT, G.; BUEGGER, F.; MUNCH, J.C. Emission of N₂O, N₂ and CO₂ from soil fertilized with nitrate: effect of compaction, soil moisture and rewetting. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 263-274, 2006.

SCHILS, R.L.M.; GROENIGEN, J.W.V.; VELTHOF, G.L.; KUIKMAN, P.J. Nitrous oxide emissions from multiple combined applications of fertilizer and cattle slurry to grassland. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 310, p. 89-101, 2008.

SILVA, I. F.; MIELNICZUK, J. Avaliação do estado de agregação do solo afetado pelo uso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 313-319, 1997.

SIMEK, M.; COOPER, J.E. The influence of soil pH on denitrification: Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 53, p. 345-354, 2002.

SIQUEIRA NETO, M. **Estoque de carbono e nitrogênio do solo com diferentes manejos do Cerrado goiano**. 2006. 159 p. Tese de Doutorado na área de Ciência do Solo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2006.

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.

SZMRECSÁNYI, T. Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.10, p.73-81, 1994.

TIEDJE, J.M.; T.O.; STEVENS, T.O. The ecology of an anaerobic dechlorinating consortium. **Environmental Biotechnology**, New York, v.13, p.3-14, 1988.

TORQUATO, S.A. **Cana de açúcar para indústria**: Análises e indicadores de agnegócios, São Paulo, v.1, 132p. 2006.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C.; SARRIÉS G.A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, p.636-646, 2002.

THROBÄCK, I. N.; ENWALL, K.; JARVIS, A. HALLIN, S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 401–417, 2004.

UNICA- União da Agroindústria Canavieira de São Paulo – **Relatório da produção de cana-de-açúcar no país**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.unica.com.br/relatórios/2007>. Acesso em: jan.2011.

_____. **Relatório da produção de cana-de-açúcar no país**, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/relatórios/2012>. Acesso em: set. 2012.
VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Boca Raton, v.19, p.703-107, 1987.

VARGAS, L.K.; SELBACH, P.A. ; SÁ, E.L.S. Imobilização de nitrogênio em solo cultivado com milho em sucessão à aveia preta nos sistemas plantio direto e convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v. 35, p.76-83, 2005.

VENZKE FILHO, S.P.; FEIGL, B.J.; PICCOLO, M.C.; SIQUEIRA NETO, M. & CERRI, C.C. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de Campos Gerais – Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 599- 610, 2008.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1991. 306p.

WATANABE, R.T; FIORETTO, R.A; HERMANN, E.R. Propriedades químicas do solo e produtividade da cana-de-açúcar em função da adição da palha de colheita, calcário e vinhaça em superfície (sem mobilização). **Semina**, Londrina, v.25, p.93-99, 2004.

WATSON, R.T.; RODHE, H.; OESCHGER, H.; SIEGENTHALER, V. Greenhouse gases and aerosols. In: HOUGHTON, J.T.; JENKINS, G.T.; EPHRAUMS, J.J. (Ed.). **Climate Chance**. Cambridge, v.1, p. 1-4, 1990.

WRAGE, N.; VELTHOF, G.L.; LAANBROEK, H.J.; OENEMA, O. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of denitrification. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 229–236, 2004.

ZANATTA, J.A. **Emissão de óxido nitroso afetada por sistemas de manejo do solo e sistemas de manejo**. 2009. 79 p. Tese de Doutorado na área de Ciência do Solo - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ZHANG, H.H.; HE, P.J.; SHAO, L.M.; YUAN, L. Minimization of N₂O emissions from a plant-soil system under landfill leachate irrigation. **Waste Management**, Amsterdam, v. 29, p. 1012-1017, 2009.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, 2003.

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