

## Bactérias indicadoras da emissão de N<sub>2</sub>O em solo de pastagens afetado por urina de bovinos

**Clovis Daniel Borges<sup>(1)</sup>; Michely Tomazi<sup>(2)</sup>; Dennis Goss de Souza<sup>(1)</sup>; Daniela Oliveira Takezawa<sup>(3)</sup>; Júlio César Salton<sup>(2)</sup>; Siu Mui Tsai<sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup>Pós-Graduando em Ecologia Aplicada, pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e Centro de Energia Nuclear na Agricultura (ESALQ-CENA, USP), Piracicaba, São Paulo. clovisdb@usp.br. <sup>(2)</sup>Pesquisador(a), Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS. <sup>(3)</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e estagiária na Embrapa Agropecuária Oeste; Dourados, MS. <sup>(4)</sup>Professora Titular, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo. tsai@cena.usp.br.

**RESUMO:** Medidas diretas da redução de N<sub>2</sub>O no campo e suas relações com a comunidade microbiana são escassas. O conhecimento mais atual das associações de emissão com a comunidade microbiana tem sido inferido a partir de condições controladas. Neste estudo avaliou-se as associações das emissões de N<sub>2</sub>O com a comunidade desnitrificante do solo a campo em dois sistemas de produção, ILP e PP. A amostragem do solo foi realizada na estação experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados em dois sistemas de produção, integração lavoura-pecuária (ILP) com sucessão soja/aveia e pastagem permanente (PP), com aplicação de doses crescentes de urina (0 L-controle; 0,8 L, 1,5 L e 2,2 L). Os fluxos de N<sub>2</sub>O foram determinados por cromatografia gasosa e o número de cópias dos genes *cnorB<sub>B</sub>* e *nosZ* avaliado por PCR em tempo real (qPCR). A emissão de N<sub>2</sub>O foi maior na ILP do que na PP, tanto no solo controle (21x) como nas doses de urina (5 a 16x). As concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no solo foram maiores na ILP porém a relação NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/N<sub>2</sub>O foi menor. O número de cópias de bactéria total por grama de solo seco foi de quase 2 vezes maior em PP que ILP. A mesma tendência foi observada para o gene *cnorB<sub>B</sub>*, enquanto que maior abundância da comunidade de *nosZ* responsável pela transferência de N<sub>2</sub>O para N<sub>2</sub> foi observada na ILP. As emissões de N<sub>2</sub>O são influenciadas tanto pela comunidade microbiana como pela quantidade de substrato disponível, os quais dependem do sistema de manejo do solo.

**Termos de indexação:** ecologia microbiana, desnitrificação, gases de efeito estufa.

### INTRODUÇÃO

O aumento da concentração do gás óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) na atmosfera tem recebido especial atenção em função do seu potencial de aquecimento global, aproximadamente 300 vezes maior que o CO<sub>2</sub>. No Brasil, as atividades agrícolas contribuem com aproximadamente 80% das emissões de N<sub>2</sub>O, sendo que 50% destas emissões são referentes à criação de animais em pastagem (MCT, 2013).

A produção de N<sub>2</sub>O no solo é mediada pela dinâmica do N no sistema, a qual está diretamente

relacionada às condições climáticas e às práticas de manejo do sistema de produção que afetam as condições do solo (Piva et al., 2012). Sistemas de produção com alternância entre lavoura e pecuária tem sido apontados como promissores para ambas as atividades, resultando em melhorias da qualidade do solo quando comparados a sistemas exclusivamente com pastagem (Salton et al., 2012). A urina depositada durante o pastejo representa uma importante fonte de N disponível para as reações microbianas (Luo et al., 2010), podendo aumentar as emissões de N<sub>2</sub>O do solo.

A produção de N<sub>2</sub>O no solo está associada principalmente ao processo de desnitrificação, resultado da respiração microbiana dentro do ciclo do N, responsável em retornar o N fixado para biosfera. Este processo é favorecido sob altas condições de umidade, onde o oxigênio é limitado, e o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o carbono orgânico estão disponíveis (Luo et al., 2010). Apesar dos solos sob pastagem apresentarem em geral boa drenagem, podem ocorrer micro-sítios no interior de agregados com baixa disponibilidade de oxigênio, condições favoráveis à desnitrificação (Carter, 2007;).

Desta forma, o sistema de produção pode influenciar diretamente o potencial do solo para emissão de N<sub>2</sub>O, tanto antes como após adição de N, como na forma de urina dos animais.

Surpreendentemente, pouco se sabe sobre os possíveis reguladores e redutores de N<sub>2</sub>O por enzimas associadas à desnitrificação. Estas enzimas têm sido usualmente estudadas pela abundância dos genes *cnorB<sub>B</sub>* e *nosZ* (Mergel et al., 2001). Ademais, a comunidade microbiana do solo é capaz de regular as emissões de N<sub>2</sub>O naturalmente, podendo atuar como fonte ou dreno de N<sub>2</sub>O (Morales et al., 2010).

Contudo, não há registro de estudos com avaliação da abundância da comunidade desnitrificante em solo afetado por urina em pastagens conduzidas em integração lavoura-pecuária (ILP) e pastagem permanente (PP). O objetivo deste estudo foi avaliar as associações das emissões de N<sub>2</sub>O com a comunidade desnitrificante do solo a campo em dois sistemas de produção, ILP e PP.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na área experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, Mato Grosso do Sul (22°16'56,08" S and 54°48'17,17" W). O solo é Latossolo Vermelho, com 630 g kg<sup>-1</sup> de argila, e o clima classificado como Cwa (köppen) com verão quente e inverno seco. O experimento foi instalado em duas áreas de pastagem, sendo uma em sistema de integração lavoura-pecuária (ILP) e outra com pastagem permanente (PP), ambas pertencentes a um experimento de longa duração implantado em 1995. A área de ILP é alternada a cada 2 anos com pastagem de braquiária decumbens (*Urochloa decumbens* syn. *Brachiaria decumbens* Stapf) e a rotação soja/aveia em plantio direto. Na PP é utilizada a mesma gramínea, porém não recebe correção do solo nem fertilização desde sua implantação.

Três meses antes da instalação do experimento uma área de 50 x 30 m foi isolada em cada pastagem, para evitar interferência de fezes e urina previamente. A área da ILP encontrava-se no início da fase de pastejo, com a pastagem vigorosa devido influência da lavoura, enquanto que a PP estava bastante debilitada em função da forte geada no ano anterior.

Nos dois sistemas de manejo (ILP e PP) aplicou-se três doses crescentes de urina (0,8L, 1,5L e 2,2L) e, uma parcela foi deixada sem aplicação para controle, seguindo o delineamento em blocos casualizados com três repetições.

A urina foi coletada de vacas leiteiras alimentadas com mesmo tipo de forragem, sem suplementação no cocho, armazenada à ± 4°C por no máximo cinco dias. As doses de urina foram aplicadas sob a pastagem na parte interna de bases metálicas (0,36 x 0,56 cm) previamente fixadas no solo, simulando as excreções dos animais. Simultaneamente, numa área adjacente, com mesmo delineamento experimental, foram aplicados os mesmos tratamentos em áreas de 1,5 x 2 m, em quantidades equivalentes a área da base para avaliação das variáveis de solo.

A amostragem de ar para avaliação das emissões de N<sub>2</sub>O foi realizada pelo método da câmara estática com procedimentos descritos por Parkin e Venterea (2010), adaptando-se câmaras com 36,5 x 56,5 cm e 32 cm altura, confeccionadas com caixas de polipropileno e revestimento de manta térmica aluminizada. Foram coletados três seringas de cada câmara, nos tempos 0, 15 e 30 minutos e a concentração de N<sub>2</sub>O determinada por cromatografia gasosa. Os fluxos de N<sub>2</sub>O do solo

foram calculados pelo aumento da concentração do gás no interior da câmara na unidade de tempo.

O DNA foi extraído de amostras de solo congeladas, usando PowerSoil lizer DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Os genes funcionais que codificam 16S rRNA, *cnorBB* e *nosZ* foram quantificados pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Foi construída uma curva padrão para quantificação do número de cópias do gene usando uma diluição seriada 10<sup>8</sup> a 10<sup>2</sup> de um fragmento conhecido de DNA sequenciado por M13 PCR de clones gerados durante este estudo. a correlação linear entre a diluição e o número de cópias do gene (R≥0,99) mostrou que não houve interferência dos inibidores de PCR na quantificação do gene.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo são apresentados os resultados do 9º dia após aplicação da urina, quando foi observado aumento nas emissões de N<sub>2</sub>O (**Figura 01**). Os fluxos de emissão de N<sub>2</sub>O aumentaram com o aumento da dose aplicada, em ambas as pastagens. Para o solo com urina, a emissão na ILP foi de 5 a 16 vezes maior que na PP (**Figura 1A**), enquanto que no solo controle a diferença foi de 21 vezes. Dentre as variáveis que podem influenciar a emissão de N<sub>2</sub>O estão a porosidade preenchida por água, o carbono prontamente disponível, a temperatura do solo, a quantidade de N mineral disponível (Carter, 2007) e a especificidade da comunidade microbiana (Richardson, 2012). A temperatura do solo e a porosidade preenchida por água não diferiram entre os tratamentos (dados não apresentados), portanto não foram considerados como fonte de variação.

Os maiores teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disponível no solo na ILP (**Figura 1B**) foram determinantes para os maiores fluxos de N<sub>2</sub>O. Este comportamento foi observado também no solo controle, o que deve-se a influencia do sistema de produção na dinâmica do N mineral do solo. A pastagem da ILP havia sido implantada logo após a rotação com lavoura e provavelmente disponibilizava de N residual da cultura da soja, por outro lado, a PP não recebia N desde sua implantação. Desta forma, a aplicação de urina na ILP resultou em maiores concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disponível no solo visto que necessitava menor entrada de N no sistema para suprir as exigências da gramínea. Por outro lado, na PP a demanda do sistema por N era maior, de forma que maior parte do N pode ter sido imobilizado pela absorção da planta ou utilização pela comunidade microbiana. Somente na PP foi possível observar visualmente

variação no desenvolvimento e coloração da gramínea, principalmente na maior dose.

Entretanto, apesar da maior concentração de  $\text{NO}_3^-$  na ILP, a taxa de conversão de  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{N}_2\text{O}$  foi menor, como pode ser verificado na relação  $\text{NO}_3^-/\text{N}_2\text{O}$  (**Figura 1C**). Vários estudos apontam a desnitrificação como principal fonte de produção de  $\text{N}_2\text{O}$  (Luo et al., 2010; Carter, 2007), no entanto, a emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo depende também da atividade das bactérias envolvidas no processo de transformação do N no solo.

A comunidade total de bactérias resultou em menores densidades do gene na ILP (**Figura 1E**) e similarmente a comunidade desnitrificante *cnorB<sub>B</sub>*, responsável pela transferência de NO para  $\text{N}_2\text{O}$  foi menor na ILP (**Figura 1D**), o que explica a menor taxa de conversão do  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{N}_2\text{O}$  comparado a PP. Adicionalmente, foi observado maior abundância da comunidade de *nosZ* responsável pela transferência de  $\text{N}_2\text{O}$  para  $\text{N}_2$  na ILP que na PP (**Figura 1F**). Caso a comunidade de *nosZ* fosse menor, a emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  na ILP poderia ser aumentado. Portanto, pode-se inferir que a funcionalidade da comunidade microbiana variou em função do sistema de manejo e influenciou na emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo. Em uma relação global dos possíveis fatores que podem regular as emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  observou-se que a concentração de  $\text{NO}_3^-$  no solo resultou em uma correlação de  $R^2 = 0.99^{**}$ . Outros fatores podem ser menos impactantes, mas não deixando de ser significativos reguladores dos fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  (**Figura 2**).

Todas estas hipóteses levantadas precisam ser ainda melhor elucidadas, repetindo o experimento outros períodos durante a fase de pastagem da ILP, pois ao longo do pastejo é esperado uma redução no N do solo, o que pode influenciar nas emissões entre outros fatores.

Apesar da menor emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  na área com PP é necessário avaliar com cautela este resultado, visto que este sistema apresentou na comunidade microbiana um maior potencial para emissão de  $\text{N}_2\text{O}$ . Além disso, para avaliação da qualidade do sistema de manejo é importante a quantificação das demais fontes de emissão de gases de efeito estufa.

### CONCLUSÕES

Medidas diretas da emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo a campo e suas associações com a comunidade microbiana mostraram conexões da produção de  $\text{N}_2\text{O}$  e os genes associados as enzimas desnitrificantes.

A disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  foi determinante na emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  pelo solo.

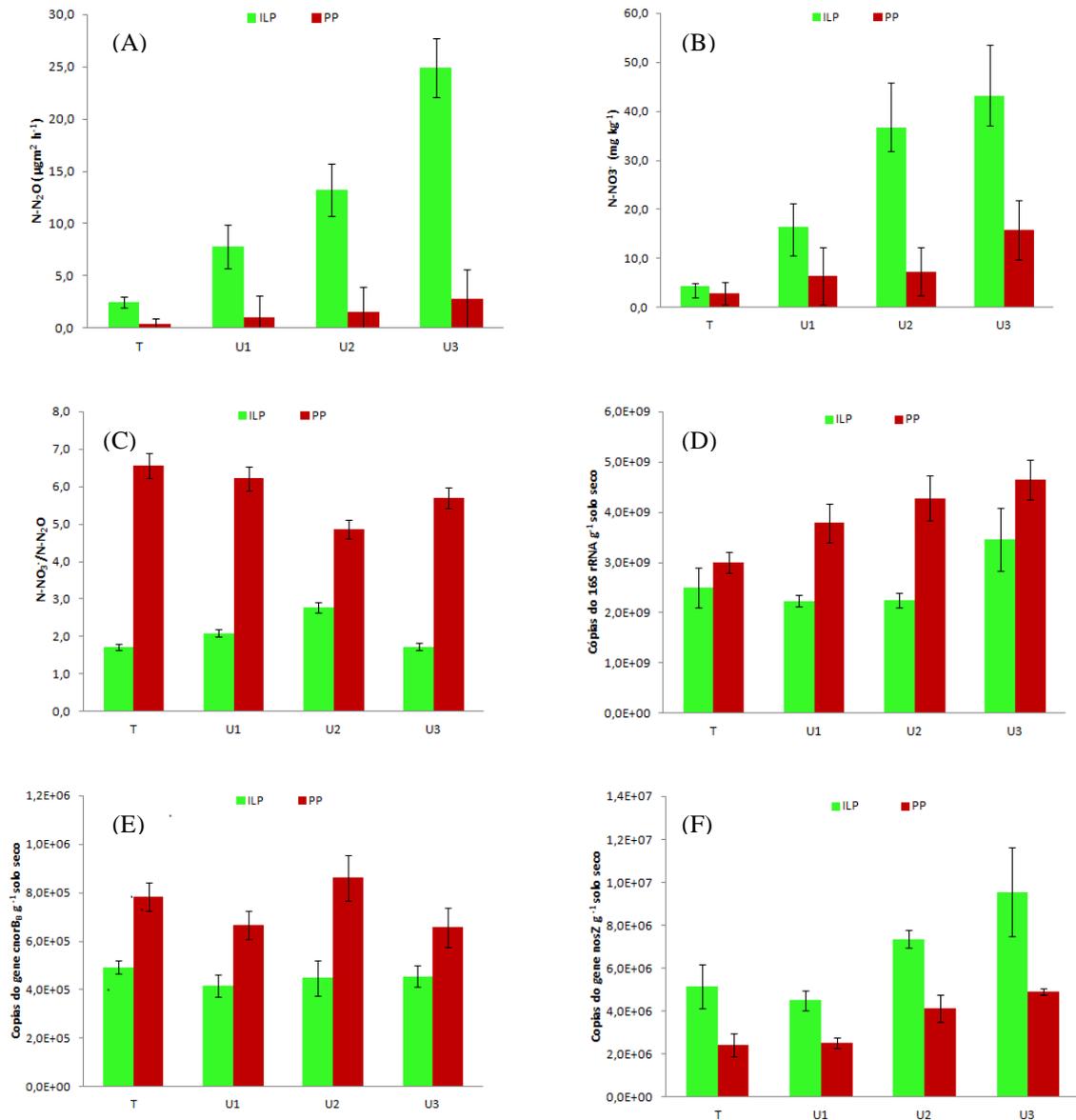
Os genes 16S rRNA, *cnorB<sub>B</sub>* e *nosZ* foram afetados pelos diferentes sistemas de produção e doses de urina aplicada.

### AGRADECIMENTOS

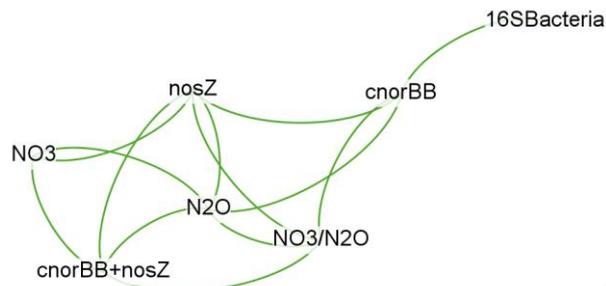
Os autores agradecem à FAPESP (2008/58114-3) e ao CNPq (564936/2010-3; 485801/2011-6; 304713/2010-4, 143307/2011-8) pelo apoio financeiro e a equipe da Embrapa Agropecuária Oeste pela condução do experimento a campo.

### REFERÊNCIAS

- CARTER, M. S. Contribution of nitrification and denitrification to  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from urine patches. **Soil Biology & Biochemistry**. 39:2091-2102, 2007.
- Ministério da Ciência e Tecnologia, 2013. Relatórios de Referência: Emissões de Óxido Nitroso de Solos Agrícolas e Manejo de Dejetos. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310922.html>. Acesso em 13/04/2013.
- SALTON, J. C.; ZANATTA, J. A.; TOMAZI, M.; SILVA, W. M. Soil organic matter in crop-livestock systems after 16 years on Midwest Brazil. In: II International Symposium on Integrated Crop-Livestock Systems, 2012, Porto Alegre. Anais do II ISICLS. Porto Alegre: INRA/UFRP/UFRGS/USDA, 2012
- LUO J, DE KLEIN CAM, LEDGARD SF, SAGGAR S. Management options to reduce nitrous oxide from intensively grazed pasture: a review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. 136:282-291, 2010.
- MERGEL, A.; KLOOS, K.; BOTHE, H. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and  $\text{N}_2$ -fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest. **Plant and Soil**, 230:145-160, 2001.
- PARKIN, T.B.; VENTEREA, R.T. Sampling Protocols. Chapter 3. Chamber-Based Trace Gas Flux Measurements. IN Sampling Protocols. R.F.Follet, editor. p. 3-1 to 3-19. Disponível: [www.ars.usda.gov/research/GRACENet](http://www.ars.usda.gov/research/GRACENet).
- PIVA, J. T.; DIECKOW, J.; BAYER, C.; ZANATTA, J. A.; MORAES, A.; PAULETTI, V.; TOMAZI, M.; PERGHER, M. No-till reduces global warming potential in a subtropical Ferralsol. **Plant and Soil**, 45: 1-15, 2012.
- RICHARDSON, D; FELGATE, H; WATMOUGH, N; THOMSON, A; BAGGS, E. Mitigating release of the potent greenhouse gas  $\text{N}_2\text{O}$  from the nitrogen cycle—could enzymic regulation hold the key? **Trends in Biotechnology**, 27:388-397, 2009.



**Figura 1.** Fluxo de  $N_2O$  (A), teores de  $NO_3^-$  (B), relação  $NO_3^- / N_2O$  (C), determinação dos genes 16S rRNA (D), *cnorBB* (E), *nosZ* (F) após 10 dias da instalação do experimento. A aplicação das doses de urina foram distribuídas da seguinte forma T= sem urina, U1= 0.8L, U2= 1.5L, U3= 2.2L corresponde a um animal adulto em dois sistemas de manejo do solo. ILP= integração lavoura-pecuária e PP= pastagem permanente.



**Figura 2.** Representação das *network* das variáveis microbiológicas e biogeoquímicas. Somente as correlações com  $p < 0,05$  foram usadas para construção da *network*.