

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ABUNDÂNCIA DE GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO NO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE *BIOCHAR*

Marcela Lamas Cosenza^{1,3}, Fernanda Palmeira Gabetto^{2,3}, Joao Luis Nunes
Carvalho³.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS),
Alto Universitário, s/nº, Guararema – 29500-000 - Alegre - ES, Brasil,
marcelacosenza.99@gmail.com.

²Universidade de São Paulo/Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Avenida
Pádua Dias, 11 - 13418-900 - Piracicaba- SP, Brasil, fernanda.gabetto@lnbr.cnpem.br.

³Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais/Laboratório de Biorrenováveis, R. Giuseppe
Máximo Scolfaro, 10000, Polo II de Alta Tecnologia - 13083-100 – Campinas-SP, Brasil,
joao.carvalho@lnbr.cnpem.br

Resumo

O ciclo do nitrogênio, mediado pelos microrganismos do solo, é a principal fonte de emissão de óxido nitroso (N₂O). Este gás é emitido naturalmente, porém, as atividades antropogênicas relacionadas a agricultura, para produção de alimentos e energia intensificam a emissão deste gás, o que se torna preocupante visto o cenário atual de emergência climática. Como uma forma de mitigar as emissões, o *biochar* pode ser aplicado no solo e estudos estão sendo feitos para esclarecer os efeitos da aplicação na comunidade microbiana. Ainda há uma brecha muito grande de experimentos realizados em solos tropicais, por isso, o objetivo deste trabalho é entender o efeito do *biochar* em alguns dos principais genes relacionados ao ciclo do nitrogênio nessas condições. As análises foram realizadas através da extração do material genético de amostras de solo e amplificações através de RT-qPCR. O gene relacionado a etapa de nitrificação em bactérias apresentou uma maior abundância nos picos de emissão de N₂O. Ainda se fazem necessários estudos futuros para elucidar as interações entre o *biochar* e os componentes dos solos.

Palavras-chave: Genes de interesse. Ciclo do Nitrogênio. Emissão de GEEs.

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

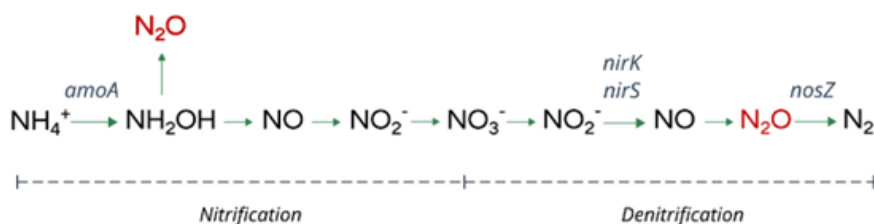
Introdução

Os gases de efeito estufa (GEEs) são considerados, atualmente, os principais contribuintes para a mudança climática. A agricultura é responsável por 78% das emissões globais de óxido nitroso (N₂O), um gás que possui um potencial de aquecimento 273 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) (FOSTER et al., 2021). A produção e emissão desse gás ocorre naturalmente e 75% do total que é emitido na atmosfera é produzido pelos solos (TIAN et al., 2020). Todavia, a atividade antropogênica relacionada a agricultura e utilização de fertilizantes nitrogenados aumenta a emissão deste gás e perturba seu ciclo natural. Em resposta a este cenário, nas últimas cinco décadas a concentração de N₂O na atmosfera registrou um aumento significativo de mais de 20% (TIAN et al., 2020)

O N₂O é produzido durante o ciclo do nitrogênio (N) protagonizado por microrganismos presentes nos solos, principalmente bactérias e arqueias. Os genes envolvidos na síntese das principais enzimas que fazem parte do ciclo são o *amoA*, presente em bactérias (AOB-*amoA*) e em arqueias (AOA-*amoA*), que é ativo durante o processo de nitrificação; o *nirS* e o *nirK*, ativos no processo de desnitrificação onde o N₂O é produzido; e por fim, o *nosZ*, que é ativo no processo de desnitrificação completa. Esta última etapa é responsável por reduzir o N₂O novamente a gás dinitrogênio (N₂) (Figura 1).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1. Ciclo do Nitrogênio e os principais genes envolvidos.



Fonte: Gabetto (2023).

Recentemente, estudos mostraram que o *biochar* pode ser empregado como uma estratégia para mitigar as emissões de N_2O dos solos e diminuir os efeitos dos fertilizantes nitrogenados (CAYUELA et al., 2013; LIU et al., 2018; KAUR et al., 2022). O *biochar* é o resíduo sólido da pirólise realizada para a produção de biocombustíveis, e é um poroso, rico em carbono, que apresenta um grande potencial para ser aplicado no solo devido a potencialmente reduzir as emissões de N_2O e promover o sequestro de carbono. Sua aplicação pode afetar diretamente os microrganismos relacionados ao ciclo do nitrogênio, como apontado por estudos prévios (CAYUELA et al., 2013; LIU et al., 2020; JOSEPH et al., 2021; FANG et al., 2022). Para uma mitigação eficiente é preciso entender a interação entre a aplicação do *biochar* e a dinâmica da microbiota do solo. Este trabalho possui como objetivo investigar esta interação através da comparação entre a abundância do gene da etapa de nitrificação em bactérias e em arqueias, após aplicação de diferentes concentrações do *biochar*.

Metodologia

Um experimento de 60 dias foi conduzido em casa de vegetação com mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. Cinco condições foram testadas em 5 replicatas cada. Os tratamentos consistiram em: solo (CTR); solo com fertilizante nitrogenado (NF); NF com 15 Mg ha⁻¹ de palha de cana sobre o solo (NF+S); NF com 5 Mg ha⁻¹ de *biochar* (NF+B5); e NF com 10 Mg ha⁻¹ de *biochar* (NF+B10). Foram retiradas amostras de solo com 3 cm de profundidade em quatro dias de coleta (3, 11, 39, e 60 dias após a adubação com N) ao longo do experimento. O solo coletado foi inserido em tubos Eppendorf de 2 ml e armazenados em temperatura -80°C até o uso.

Das amostras coletadas, foram retirados 0.300 mg de solo para a extração de DNA seguindo as instruções do kit *FastDNA SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals – Santa Ana, CA, USA). A confirmação do DNA extraído foi feita através de gel de eletroforese e a concentração das amostras foi determinada pelo equipamento *NanoDrop2000c* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

O PCR quantitativo (RT-qPCR) foi realizado para quantificar o relacionado a abundância total de bactérias (16S) e os genes funcionais relacionados a produção das enzimas participantes da nitrificação (*amoA*), em bactérias (AOB) e arqueias (AOA). O RT-qPCR foi realizado no equipamento *StepOne Plus™ Real Time PCR System* (Applied Biosystems). O reagente utilizado foi o *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

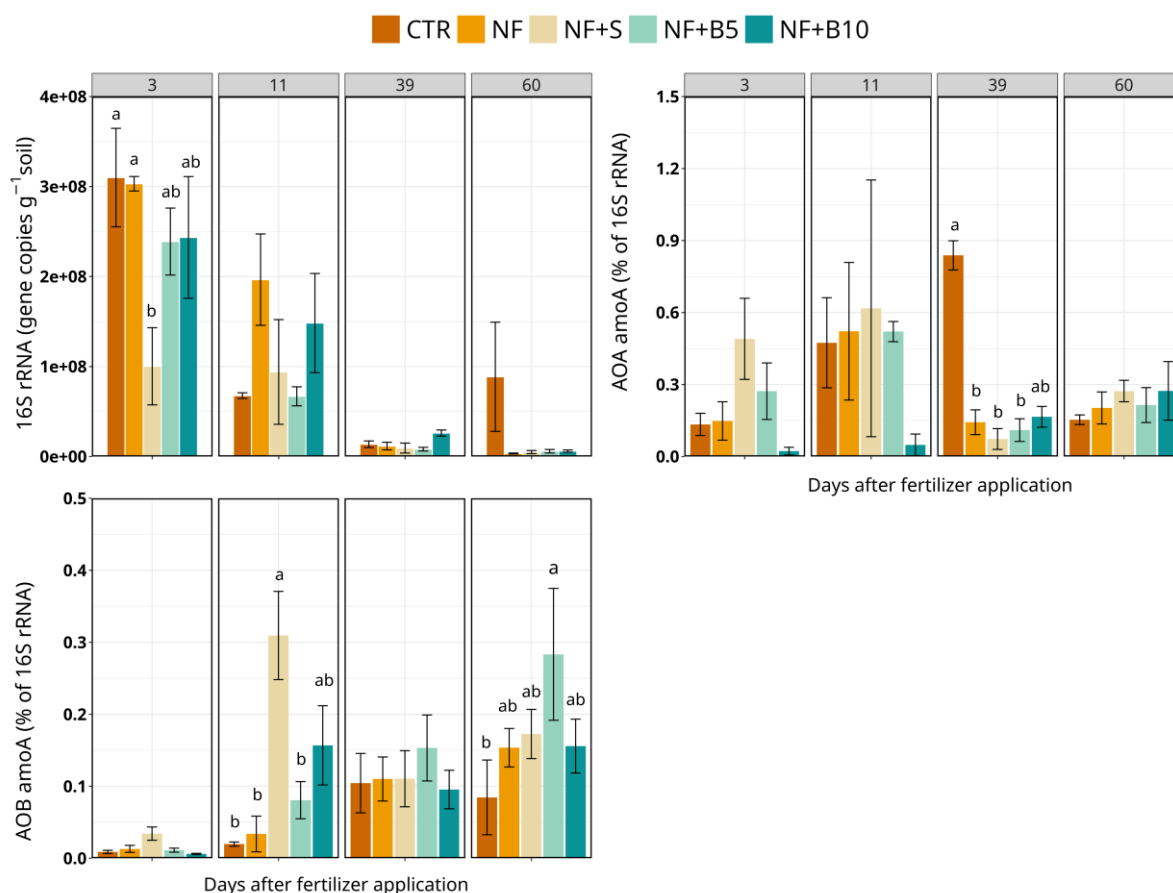
Os dados obtidos do RT-qPCR foram utilizados para calcular a abundância relativa dos genes de interesse. Os valores absolutos de cada gene foram normalizados a partir do total de bactérias que foi quantificado em cada amostra, assim, o total de cópias de cada gene foi dividido pelo total de cópias do 16S. As análises estatísticas foram analisadas no *software R* (R Core Team, 2023), e as comparações entre os valores obtidos foram realizadas utilizando o pacote *emmeans* com o ajuste de Tukey a $\alpha=0.05$.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

De maneira geral, a abundância relativa dos genes funcionais variou de acordo com a aplicação dos tratamentos (Figura 2). Em relação aos genes da etapa de nitrificação, o AOA-*amoA* obteve um pico maior em comparação ao AOB-*amoA* nos dias 3 e 11 após a fertilização. A única diferença observada quanto a abundância relativa de AOA *amoA* foi ao 39 DAF, onde o CTR teve média superior a todos os tratamentos exceto NF+B10. Quanto a abundância relativa do gene AOB-*amoA*, onze dias após a aplicação do fertilizante nitrogenado o tratamento NF+S apresentou a maior média em relação ao gene AOB-*amoA*, sendo 90% mais elevada do que a média do tratamento NF. Em comparação aos outros tratamentos, o NF+S apresentou ainda abundância relativa AOB-*amoA* similar ao tratamento NF+B10 aos 11 DAF. Ao final do experimento, a abundância relativa de AOB-*amoA* sob o tratamento NF+B5 foi maior do que em CTR.

Figura 2 - Abundância dos genes relacionados a nitrificação, em arqueias (AOA-*amoA*) e bactérias (AOB-*amoA*) relativo à abundância do 16S rRNA nos diferentes tratamentos. Os dados que apresentam letras diferentes possuem significância estatística calculadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).



Discussão

Estudos demonstraram que o *biochar* é capaz de influenciar a biomassa e atividade microbiana nos solos (POKHAREL et al., 2020; LIU et al., 2020; JOSEPH et al., 2021). A aplicação do *biochar* aumenta a disponibilidade de recursos do solo adicionando carbono lábil a área, principal constituinte de compostos orgânicos que são facilmente mineralizados pelos microrganismos. A superfície e os poros do *biochar* também podem agir como habitats para os microrganismos e aumentar o movimento de nutrientes, água e ar, modificando o microambiente do solo (POKHAREL et al., 2020).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Em solos de clima temperado, a etapa de desnitrificação é a principal fonte de N_2O (KAUR et al., 2022). Em nossos resultados o gene AOB-*amoA* demonstrou os maiores picos de abundância. Em solos com o *water-filled por space* (WFPS) entre 35% e 60%, foi demonstrado que a etapa de nitrificação é a principal fonte de emissão do gás (KAUR et al., 2022). Desta maneira, estudos prévios realizados em solos tropicais observaram que a aplicação de resíduos da cana de açúcar, como palha e vinhaça, é capaz de provocar um aumento abundante de bactérias oxidadoras de amônio (SOARES et al., 2016; LOURENÇO et al., 2018). De acordo com estes estudos prévios, nossos resultados demonstraram que a presença da palha sobre o solo e aplicação de *biochar* na dose de 10 Mg ha⁻¹ provocou um aumento na abundância relativa do AOB-*amoA*. Apesar de ambos os genes, AOA-*amoA* e AOB-*amoA*, estarem relacionados com a emissão de N_2O , foi demonstrado que o AOB é responsável por 70% do N_2O derivado da etapa de nitrificação (LIANG; ROBERTSON, 2021), isso pode ser explicado pelas alterações na composição das populações de bactérias nitrificantes.

Muitos estudos corroboram esta hipótese e demonstram que, em solos tropicais, os genes AOB possuem uma relação íntima com a emissão de N_2O (PAJARES; BOHANNAN, 2016; GRASSMANN et al., 2022). A resposta da aplicação do *biochar* depende de muitos fatores, tanto abióticos quanto bióticos, e ainda há a necessidade de aprofundar os estudos nos solos tropicais para entender a fundo essas interações e possibilitar a aplicação do *biochar* como uma técnica de manejo para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa.

Conclusão

Através do presente trabalho pode-se observar que a abundância dos genes variou com os diferentes tratamentos e a presença da palha de cana induziu um aumento na abundância relativa do gene AOB-*amoA*, o que pode explicar o aumento nas emissões de N_2O . Os resultados aqui obtidos são fundamentais para ajudar a melhorar a compreensão acerca do uso do *biochar* em solos tropicais e complementar estudos e projetos futuros para a sua aplicação, uma vez que a maioria dos estudos incluindo o *biochar* são realizados em climas temperados.

Referências

CAYUELA, Maria Luz et al. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N_2O emissions?. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1732, 2013.

FANG, Wensheng et al. Microbial regulation of nitrous oxide emissions from chloropicrin-fumigated soil amended with biochar. **Journal of Hazardous Materials**, v. 429, p. 128060, 2022.

FOSTER, P et al. The Earth's Energy Budget, Climate Feedbacks, and Climate Sensitivity. In V. Masson-Delmotte, P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, & B. Zhou (Eds.), **Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** (pp. 923–1054). Cambridge University Press. 2021.

LI S; SONG, L; JIN, Y; LIU, S; SHEN, Q; ZOU, J. Linking N_2O emission from biochar-amended composting process to the abundance of denitrify (*nirK* and *nosZ*) bacteria community. **AMB Express** 6:37, 2016.

LIANG, D., & ROBERTSON, G. P. Nitrification is a minor source of nitrous oxide (N_2O) in an agricultural landscape and declines with increasing management intensity. **Global Change Biology**, 27(21), 5599–5613, 2021. <https://doi.org/10.1111/gcb.15833>

LIU, Qi et al. How does biochar influence soil N cycle? A meta-analysis. **Plant and soil**, v. 426, p. 211-225, 2018.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

LIU, Xingren et al. Effects of biochar on nitrification and denitrification-mediated N₂O emissions and the associated microbial community in an agricultural soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 6649-6663, 2020.

LOURENÇO, K. S. et al. Dominance of bacterial ammonium oxidizers and fungal denitrifiers in the complex nitrogen cycle pathways related to nitrous oxide emission. *GCB Bioenergy*, 10(9), 645–660. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12519>. 2018.

POKHAREL, Prem; MA, Zilong; CHANG, Scott X. Biochar increases soil microbial biomass with changes in extra-and intracellular enzyme activities: a global meta-analysis. **Biochar**, v. 2, p. 65-79, 2020.

SOARES, J. R. et al. Nitrous oxide emission related to ammonia-oxidizing bacteria and mitigation options from N fertilization in a tropical soil. *Scientific Reports*, 6(July), 1–11. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep30349>.

TIAN, Hanqin et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. **Nature**, v. 586, n. 7828, p. 248-256, 2020.

KAUR, Navneet et al. How much is soil nitrous oxide emission reduced with biochar application? An evaluation of meta-analyses. **GCB Bioenergy**, v. 15, n. 1, p. 24-37, 2023.