

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Emissões de N₂O na cultura da soja inoculada com
diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* sp.**

Wadson de Menezes Santos

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**EMISSÕES DE N₂O NA CULTURA DA SOJA INOCULADA COM
DIFERENTES ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* spp.**

WADSON DE MENEZES SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Bruno José Rodrigues Alves

e Co-orientação do Professor
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia (Ciência do Solo), Área de
Concentração em Manejo do Solo e
Qualidade Ambiental.

Seropédica, RJ
Agosto de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676a	Santos, Wadson de Menezes, 1991- Acúmulo e persistência de carbono e nitrogênio no solo em experimentos com diferentes sistemas de manejo/Wadson de Menezes Santos. – Seropédica, 2021. 81 f.: il. Orientador: Bruno José Rodrigues Alves. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2021. 1. Mudanças climáticas. 2. Manejo do solo. 3. Fracionamento da matéria orgânica do solo. I. Alves, Bruno José Rodrigues, 1966-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.
-------	---

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) modalidade bolsa FAPERJ NOTA 10 – Nº Processo: E_26/200.759/2019.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 20 / 2021 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.064055/2021-11

Seropédica-RJ, 02 de setembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

WADSON DE MENEZES SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Manejo do Solo e Qualidade Ambiental.

TESE APROVADA EM 30/08/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 03/09/2021 20:00)

ADELSON PAULO DE ARAUJO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DATS (11.39.00.35)
Matrícula: 1104775

(Assinado digitalmente em 13/09/2021 10:24)

SELENOBALDO ALEXINALDO CABRAL DE SANT ANNA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 589.564.335-34

(Assinado digitalmente em 02/09/2021 18:01)

BEATA EMOKE MADARI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 056.451.107-22

(Assinado digitalmente em 02/09/2021 17:08)

BRUNO JOSE RODRIGUES ALVES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 681.282.827-00

(Assinado digitalmente em 03/09/2021 07:37)

CLAUDIA POZZI JANTALIA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 139.630.858-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **20**, ano: **2021**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **02/09/2021** e o código de verificação: **a91896691a**

DEDICATÓRIA

*A Deus,
meus pais e irmãos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar sempre o meu caminho e por me dar forças durante todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais José Cláudio e Josefa Auxiliadora pelas orações, força e amor. Aos meus irmãos Rainara e Murillo pelo carinho e apoio. A minha namorada Laisa Gois pelo amor, companheirismo e paciência.

Aos meus amigos Eduardo Bender, Josimar Batista e Selenobaldo pela motivação e apoio a entrar na UFRRJ/Embrapa Agrobiologia. Aos pesquisadores do Projeto Petrobras, Dr. Inácio de Barros, Dr. Edson Patto e Dr. Marcelo Fernandes pelo incentivo e confiança, e em especial a Dra. Claudia Jantalia pela grande parceria, acolhimento e ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Bruno Alves pela paciência, conselhos, apoio e ensinamentos acadêmico e profissional em todos os momentos desta jornada. Ao Dr. Segundo Urquiaga e Dr. Robert Boddey pelo apoio e ensinamentos técnico-científicos. Ao Dr. Jerri Zilli pela parceria no projeto de tese e disponibilidade.

Aos meus amigos Ricardo Cesário, Karla Emanuelle, Carlos Vergara, Mariana Fernandes pela amizade e apoio em todos os momentos. Aos amigos do Grupo de Ciclagem de Nutrientes, Márcio Martins, Isabel, Camila, Edevaldo, Roni, Elderson e Rafael.

Aos colaboradores da Embrapa Agrobiologia Alderi, Luciano e Hernani pelo apoio no campo, e a Andreia Loviane, Renato Montinho, Altiberto, Roberto Grégio e Ednelson pelo apoio nas análises laboratoriais.

Ao Cleudison Gabriel, Dr. Jean e Dr. Jerri pelo apoio nas análises moleculares.

A FAPERJ pela concessão de bolsa de estudos.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do solo e aos seus professores. A Embrapa Agrobiologia pela oportunidade e apoio no desenvolvimento dos trabalhos da tese.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu pudesse concluir esta tese.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Wadson de Menezes Santos, filho de José Claudio dos Santos e Josefa Auxiliadora de Menezes Santos, nasceu na cidade de Lagarto (SE), em 9 de maio de 1991. Em abril de 2014, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão (SE). Durante o período da graduação foi estagiário voluntário, e bolsista de iniciação científica (PIBIC) entre os anos de 2010 e 2014. Paralelo à graduação, em 2012 iniciou o curso técnico em Edificações pelo Instituto Federal de Sergipe, em Aracaju, concluindo em 2014. Em março de 2014, foi contratado como bolsista de desenvolvimento tecnológico e industrial (DTI) pelo Projeto Misturas Homogêneas do Nordeste firmado pela parceria entre a Petrobras e a Embrapa Tabuleiros Costeiros. Em março de 2015 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade da Universidade Federal de Sergipe, como bolsista CAPES, desenvolvendo o projeto de dissertação na Embrapa Tabuleiros Costeiros, intitulada “Desempenho agrônômico e volatilização da amônia de fertilizantes pastilhados e convencionais na cultura de milho” defendida em fevereiro de 2017. Em março de 2017 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como bolsista FAPERJ-NOTA 10, com as atividades de tese desenvolvidas na Embrapa Agrobiologia.

RESUMO

SANTOS, Wadson de Menezes. **Emissões de N₂O na cultura da soja inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp.** 2021. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A soja (*Glycine max* [L.] Merr.) devido ao seu teor de proteína nos grãos, necessita de elevado aporte de nitrogênio (N), que é fornecido pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) pela inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para soja no Brasil. Essas estirpes de bactérias possuem capacidade de desnitrificação diferentes entre si, o que pode afetar as emissões de N₂O. Conhecer essa característica de cada uma das estirpes mais utilizadas no mercado pode se tornar uma estratégia para mitigar as emissões de N₂O na cultura da soja. Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência agrônômica e as emissões de N₂O na cultura da soja pela inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. com diferentes capacidades desnitrificantes. Foi realizado um experimento *in vitro*, dois experimentos em campo, o primeiro entre os anos de 2017 e 2018, e o segundo em 2020 na Estação Experimental da Embrapa Agrobiologia, um outro experimento em casa de vegetação foi realizado entre 2019 e 2020, todos na Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica, RJ. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco repetições, e os tratamentos consistiram na inoculação das sementes de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas no Brasil, que são a CPAC 7 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), CPAC 15 (*Bradyrhizobium japonicum*), 29 W e SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*), mais o tratamento Controle (sem bactéria) e Solo (sem planta). No experimento *in vitro* o delineamento foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Nos experimentos em campo, a estirpe 29W apresentou em geral elevada massa seca de nódulos, altas taxas de FBN e balanço positivo de N para o solo. A SEMIA 587 aumentou a produtividade em relação ao Controle, não diferindo das demais estirpes no experimento 2017/2018, já no experimento 2020 não houve efeito ($p < 0,05$) da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. O N é acumulado em maiores proporções nos grãos da soja, e as folhas senescentes e os nódulos são as partes da planta que mais contribuem com N para o solo. Nos experimentos em campo não houve efeitos das estirpes nas emissões de N₂O, sendo o preparo do solo e a decomposição dos resíduos no final do ciclo e pós-colheita os fatores que mais influenciaram as emissões. Os fatores de emissão (FE) foram menores que o valor de 1% estabelecido pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), exceto para o tratamento Controle e a CPAC 15 no experimento de campo 2020. Em condições de casa de vegetação a CPAC 7, SEMIA 587 e 29W apresentaram elevada FBN, e a CPAC 7 reduz as emissões de N₂O na cultura da soja, resultado que foram comprovados com os genes de desnitrificação observados nos nódulos. No experimento *in vitro* o acetileno inibiu a óxido nítrico redutase (*nosZ*), permitindo uma maior emissão de N₂O.

Palavras-chave: Óxido nítrico redutase. ¹⁵N. Fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

SANTOS, Wadson de Menezes. **N₂O emissions in soybean culture inoculated with different strains of *Bradyrhizobium* spp.** 2021. 81p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) is the main Brazilian agricultural crop. Due to its high protein content (40%), it needs a high supply of nitrogen (N), which is provided by biological nitrogen fixation (BNF) by inoculating with it strains of *Bradyrhizobium* spp. recommended for soybeans in Brazil. These strains have different denitrification capacities that can affect N₂O emissions. The management of these strains can become a strategy to mitigate N₂O emissions the production of soybean. This study aimed to evaluate agronomic efficiency and N₂O emissions in soybean by inoculation of strains of *Bradyrhizobium* spp. with different denitrifying capacities. An in vitro experiment was carried out, two field experiments were conducted, the first between the years 2017 and 2018, and the second in 2020 at the Embrapa Agrobiologia Experimental Station, another greenhouse experiment was carried out between 2019 and 2020 at Embrapa Agrobiologia, both located Seropédica, Rio de Janeiro. The experimental design was a randomized block, with five replications, and the treatments consisted of inoculating soybean seeds with strains of *Bradyrhizobium* sp. recommended in Brazil, which are CPAC 7 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), CPAC 15 (*Bradyrhizobium japonicum*), 29 W and SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*), more Control (without bacteria) and Soil (without plant) treatment. In the in vitro experiment, the design was completely randomized, with five replications. In field experiments, strain 29W generally presented a high nodule dry mass, these results were also reflected in high BNF rates and positive N balance for the soil. SEMIA 587 increased productivity compared to Control, not differing from the other strains in the 2017/2018 experiment, whereas in the 2020 experiment there was no effect ($P < 0.05$) of the inoculation with *Bradyrhizobium* spp. N is accumulated in greater proportions in soybeans, and senescent leaves and nodules are the parts of the plant that most contribute N to the soil. In the field experiments, there was no effect of the strains on N₂O emissions, with soil preparation in the field and in the pot and the decomposition of residues at the end of the cycle and post-harvest are the factors that most influenced the emissions. EFs were less than 1% established by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), except for Control treatment and CPAC 15 in the 2020 field experiment. Under greenhouse conditions, CPAC 7, SEMIA 587 and 29W presented high BNF, and CPAC 7 reduces N₂O emissions in soybean, results that were proven with the denitrification genes observed in the nodules. In the in vitro experiment, acetylene inhibited nitrous oxide reductase (*nosZ*), allowing a greater emission of N₂O.

Key words: Nitrous oxide reductase. ¹⁵N. Biological nitrogen fixation.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Genes de desnitrificação no genoma de bactérias usadas como inoculantes na soja, identificados usando Genomas Microbianos Integrados (IMG) (https://img.jgi.doe.gov/) e o serviço de anotação de genomas procarióticos baseados em RAST/SEED (http://rast.nmpdr.org/rast.cgi).....	10
Tabela 2. Características químicas do solo do experimento em casa de vegetação no município de Seropédica, RJ.....	15
Tabela 3. Características químicas do solo na profundidade de 0-20 cm das áreas experimentais nos experimentos 2017/2018 e 2020 no município de Seropédica, RJ.	17
Tabela 4. Sequência dos primers e condições das reações de PCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação <i>norC</i> e <i>nosZ</i>	26
Tabela 5. Sequência dos primers e condições das reações de qPCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação <i>nirK</i> e <i>nosZ</i>	28
Tabela 7. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea por planta de soja (cv. BRS 284) inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas e solo utilizados como referência no experimento em casa de vegetação.....	33
Tabela 8. Emissão acumulada de N_2O ($\text{mg N-N}_2\text{O ha}^{-1}$), e presença nos nódulos dos genes (PCR) <i>norC</i> e <i>nosZ</i> relacionados com a desnitrificação no genoma de diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. inoculados na soja (cv. BRS 284) no experimento em casa de vegetação. Sinal positivo (+) indica presença e negativo (-) indica ausência do gene.....	36
Tabela 9. Massa seca de nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas em duas épocas.	39
Tabela 10. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas em duas épocas.	41
Tabela 11. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea e vagem por planta de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas referência.	42
Tabela 12. Massa seca de nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e produtividade de grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	44
Tabela 13. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	46
Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.	46
Tabela 14. Nitrogênio total acumulado, nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e do solo, nitrogênio depositado no solo e balanço de N pela FBN de soja cultivar	

TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 49

Tabela 15. Emissão acumulada de N₂O (g N-N₂O ha⁻¹), intensidade de emissão (g N-N₂O kg grãos⁻¹) e fator de emissão (%) da soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabela 1. Genes de desnitrificação no genoma de bactérias usadas como inoculantes na soja, identificados usando Genomas Microbianos Integrados (IMG) (https://img.jgi.doe.gov/) e o serviço de anotação de genomas procarióticos baseados em RAST/SEED (http://rast.nmpdr.org/rast.cgi).....	10
Tabela 2. Características químicas do solo do experimento em casa de vegetação no município de Seropédica, RJ.....	15
Tabela 3. Características químicas do solo na profundidade de 0-20 cm das áreas experimentais nos experimentos 2017/2018 e 2020 no município de Seropédica, RJ.	17
Tabela 4. Sequência dos primers e condições das reações de PCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação <i>norC</i> e <i>nosZ</i>	26
Tabela 5. Sequência dos primers e condições das reações de qPCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação <i>nirK</i> e <i>nosZ</i>	28
Tabela 7. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea por planta de soja (cv. BRS 284) inoculada com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas e solo utilizados como referência no experimento em casa de vegetação.....	33
Tabela 8. Emissão acumulada de N_2O ($\text{mg N-N}_2\text{O ha}^{-1}$), e presença nos nódulos dos genes (PCR) <i>norC</i> e <i>nosZ</i> relacionados com a desnitrificação no genoma de diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. inoculados na soja (cv. BRS 284) no experimento em casa de vegetação. Sinal positivo (+) indica presença e negativo (-) indica ausência do gene.....	36
Tabela 9. Massa seca de nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas em duas épocas.	39
Tabela 10. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas em duas épocas.	41
Tabela 11. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea e vagem por planta de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas referência.	42
Tabela 12. Massa seca de nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e produtividade de grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	44
Tabela 13. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	46
Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.	46
Tabela 14. Nitrogênio total acumulado, nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e do solo, nitrogênio depositado no solo e balanço de N pela FBN de soja cultivar	

TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 49

Tabela 15. Emissão acumulada de N₂O (g N-N₂O ha⁻¹), intensidade de emissão (g N-N₂O kg grãos⁻¹) e fator de emissão (%) da soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Importância da Cultura da Soja	4
2.2 Bactérias Diazotróficas Utilizadas como Inoculantes da Soja no Brasil	4
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	5
2.4 Mecanismo Bioquímico da Respiração Aeróbica e Desnitrificação	6
2.5 Relação entre o Processo de FBN e a Desnitrificação.....	7
2.5.1 Desnitrificação como mecanismo de desintoxicação nos nódulos	8
2.6 Desnitrificação das Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. Inoculadas na Soja	9
2.7 Influência Direta da FBN nas Emissões de N ₂ O pela Simbiose com Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. na Soja.....	10
2.7.1 Influência da atividade da hidrogenase nas emissões de N ₂ O	11
2.8 Influência Indireta da FBN nas Emissões de N ₂ O pela Decomposição de Resíduos da Soja	12
2.9 Fator de Emissão do N ₂ O na Cultura da Soja.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Delineamento Estatístico	14
3.2 Experimento <i>In Vitro</i>	14
3.3 Experimento em Casa de Vegetação	15
3.4 Descrição das Áreas dos Experimentos em Campo.....	16
3.5 Implantação e Condução dos Experimentos em Campo	17
3.6 Avaliação das Emissões de N ₂ O na Soja.....	18
3.7 Monitoramento dos Teores de Nitrato, Amônio e Umidade do Solo	21
3.8 Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio	22
3.9 Senescência das Folhas dos Experimentos em Campo.....	23
3.10 Produtividade de Grãos.....	23
3.11 Balanço de Nitrogênio na Soja dos Experimentos em Campo	24
3.12 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real (qPCR).....	24
3.12.1 Coleta e preparo das amostras de nódulos e solo para extração de DNA	24
3.12.2 Extração de DNA dos nódulos e solo	24
3.12.3 Condições da reação da PCR dos nódulos	25
3.12.4 Condições da reação da qPCR dos nódulos e solo.....	27
3.13 Análises Estatísticas.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Emissões de N ₂ O no Experimento em <i>In Vitro</i>	30
4.2 Nodulação e Componentes da Produtividade no Experimento em Casa de Vegetação	31
4.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Experimento em Casa de Vegetação	32
4.4 Emissões de N ₂ O no Experimento em Casa de Vegetação	33
4.5 Nodulação nos Experimentos em Campo.....	39
4.6 Fixação Biológica de Nitrogênio nos Experimentos em Campo.....	41

4.7 Produtividade e Acúmulo de Massa Seca nos Experimentos em Campo.....	43
4.8 Acúmulo e Exportação de Nitrogênio nos Experimentos em Campo	45
4.9 Balanço de Nitrogênio nos Experimentos em Campo	47
4.10 Emissão de N ₂ O nos Experimentos em Campo.....	50
5. CONCLUSÕES	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A mitigação das emissões de gases de efeito estufa (GEE) é atualmente uma das principais preocupações políticas e científicas, devido à sua relação com o aquecimento global e as mudanças climáticas (TORTOSA et al., 2015). O óxido nitroso (N_2O) é um importante gás de efeito estufa, e apresenta um potencial de aquecimento global 296 vezes maior que o dióxido de carbono (CO_2) e uma vida útil de 120 anos (MIHRE et al., 2013). A concentração de N_2O atmosférico aumentou de 270 ppb no período pré-industrial (1000-1750) para 330 ppb em 2017 (WMO, 2018).

Em escala global, a agricultura é a maior fonte de N_2O ($4,1 \text{ Tg N-N}_2\text{O ano}^{-1}$) contribuindo com 60% de todas as emissões antropogênicas desse gás (UNEP, 2013; CIAIS et al., 2014). Os processos microbiológicos responsáveis pela emissão de N_2O nos solos agrícolas são a nitrificação, e principalmente a desnitrificação (THOMSON et al., 2012; RUSER; SCHULZ, 2015). A aplicação de N-fertilizantes é a principal fonte de N_2O , sendo responsável pela emissão da metade do N_2O antropogênico global (SHCHERBAK et al., 2014; UCHIDA; VON REIN, 2019).

A simbiose entre leguminosa e rizóbio é uma alternativa eficaz e sustentável para substituir a fertilização nitrogenada em culturas de leguminosas (TORTOSA et al., 2015; ZILLI et al., 2019). A atmosfera é composta por 78% de N_2 , porém para este N entrar no sistema solo-planta em formas disponíveis às plantas é necessário que ocorra a fixação biológica de N_2 (FBN) ou a fixação química, através da produção industrial de fertilizantes pelo processo Haber-Bosch, ou ainda, em menor proporção, através de descargas elétricas atmosféricas (FOWLER et al., 2013). Enquanto a fixação química requer uma grande quantidade de energia fóssil, para se alcançar as condições de temperatura e pressão para quebra da ligação trivalente da molécula de N_2 , a energia na FBN vem da fotossíntese realizada pelas plantas, o que evita a emissão de cerca de 4,5 kg CO_2 fóssil por kg de N produzido industrialmente (ROBERTSON; GRACE, 2004).

A soja (*Glycine max* [L.] Merr.) é a principal leguminosa cultivada no mundo representando 77% de todo N_2 fixado globalmente entre as culturas de leguminosas (HERRIDGE et al., 2008). A expansão da soja para áreas tropicais com solos deficientes em nitrogênio está ligada à sua alta capacidade de fixar N_2 em simbiose com *Bradyrhizobium* spp. (HUNGRIA et al., 2015), podendo acumular mais de 300 kg N ha^{-1} . Estima-se que no Brasil a fixação média seja de 80%, não requerendo a aplicação de N-fertilizante (CREWS; PEOPLES, 2004; HERRIDGE et al., 2008). Isso foi possível devido ao melhoramento genético associado à seleção de estirpes eficientes para a soja (ALVES et al., 2003).

Porém, além de fixar nitrogênio algumas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. inoculadas na soja têm a capacidade de desnitrificar e produzir N_2O (INABA et al., 2009; ITAKURA et al., 2013; ZILLI et al., 2019). Em condição de anaerobiose o *Bradyrhizobium* spp. pode utilizar o nitrato (NO_3^-) comoceptor final de elétrons para obter energia (INABA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2017). A desnitrificação se inicia com a redução do NO_3^- a nitrito (NO_2^-) pela enzima nitrato redutase codificada pelos genes *nap/nar*. Em seguida, o NO_2^- é reduzido a óxido nítrico (NO) pela nitrito redutase (*nir*), e na sequência ocorre a redução de NO para N_2O pela enzima óxido nítrico redutase (*nor*). Por último, o N_2O é reduzido a N_2 pela enzima óxido nitroso redutase (*nos*) (BUENO et al., 2012). A atividade da hidrogenase durante a FBN é outro fator que pode influenciar nas emissões de N_2O , pois estirpes sem atividade de hidrogenase (Hup^-) produzem maior quantidade de hidrogênio (H_2) que pode estimular os desnitrificadores e aumentar as emissões de N_2O (FLYNN et al., 2014).

Entre as estirpes utilizadas como inoculantes da soja no Brasil, a CPAC 7 (=SEMIA 5080) de *Bradyrhizobium diazoefficiens* tem todos os genes necessários para desnitrificação completa para N_2 . A CPAC 15 (=SEMIA 5079), de *Bradyrhizobium japonicum*, pode desnitrificar até N_2O , pois não tem o gene *nosZ*. E as estirpes 29 W (=SEMIA 5019) e SEMIA 587, ambas *Bradyrhizobium elkanii*, não desnitrificam, pois carecem dos genes que codificam a subunidade catalítica das redutases desnitrificantes (ZILLI et al., 2019). Destas estirpes apenas a CPAC 7 apresenta hidrogenase ativa (Hup^+) (BODDEY; HUNGRIA, 1997).

A desnitrificação pelas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. pode ser realizada dentro dos nódulos, ou quando as estirpes estão em vida livre, no solo (HIRAYAMA et al., 2011; OBANDO et al., 2019). Devido estas diferenças genéticas que determinam a capacidade de desnitrificação ou não entre as estirpes, alguns resultados de pesquisa sugerem que as estirpes capazes de desnitrificar o N_2O até N_2 poderiam ser exploradas na inoculação da soja como estratégia de mitigação de emissões de N_2O (ITAKURA et al., 2013; UCHIDA; AKIYAMA, 2013).

A soja ao fixar o N_2 também pode estimular as emissões de N_2O pelo aumento da entrada de N no solo, fornecendo N adicional para a nitrificação e desnitrificação pela decomposição de resíduos da colheita, sendo os nódulos a principal fonte de N_2O em pós-colheita (ALMARAZ et al., 2009; INABA et al., 2009). Dessa forma, o impacto da cultura na produção do N_2O tem potencial, o que dependerá das condições de decomposição do resíduo, mas resta a dúvida sobre o quanto as estirpes comerciais interferem na magnitude das emissões.

A metodologia mais comumente empregada para quantificar as emissões de N_2O de culturas agrícolas utiliza o fator de emissão (FE) de 1%, ou seja, 1 kg de N- N_2O é produzido para cada 100 kg N de resíduos deixados no campo após a colheita (IPCC, 2006). No entanto, apesar da cultura da soja ser a mais importante em área plantada no Brasil, praticamente não existem avaliação das emissões de N_2O nesta cultura em diferentes regiões do território nacional. Mesmo em termos globais, existem críticas quanto as avaliações realizadas que variam no período de monitorado, frequência de amostragens, e quanto ao contexto em que o plantio é realizado (rotação de culturas ou diferentes sistemas de preparo do solo etc.). Além disso, várias avaliações das emissões de N_2O da cultura da soja não incluem o tratamento controle (sem resíduos) e quantificam o total de N dos resíduos deixados no campo, sendo difícil obter uma estimativa mais próxima da realidade (IPCC, 2006; UCHIDA; AKIYAMA, 2013).

Visto a importância socioeconômica da cultura da soja, existe a preocupação quanto aos impactos ambientais que esta pode gerar, requerendo-se estudos de campo mais detalhados, sobre as emissões de N_2O na soja com vistas a estabelecer estratégias de mitigação.

Assim, as hipóteses científicas deste trabalho foram:

- a) As emissões de N_2O na cultura da soja podem ser mitigadas pela inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. que desnitrificam totalmente o nitrato até N_2 .
- b) A decomposição de resíduos da soja é a principal fonte de N_2O ao longo do ciclo da cultura.
- c) O fator de emissão direta de N_2O da soja nas condições edafoclimáticas brasileiras é menor do que o fator *default* de 1% proposto pelo IPCC (2006).
- d) A inoculação com *Bradyrhizobium* spp. na soja aumenta o desempenho agrônômico da cultura.

Com base nas hipóteses desta tese, o objetivo geral foi avaliar o desempenho agrônômico e o potencial mitigador das emissões de N_2O na cultura da soja pela inoculação de estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* spp. que apresentam contrastantes potenciais de produção de N_2O .

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a eficiência agronômica e a contribuição da FBN pela inoculação das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Brasil.
- b) Monitorar as emissões de N₂O ao longo do ciclo da cultura da soja inoculada com diferentes estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* spp.
- c) Determinar o fator de emissão de N₂O e avaliar o balanço de nitrogênio no cultivo de soja em ambiente tropical.
- d) Avaliar como as emissões de N₂O variam na cultura da soja em função da presença dos genes responsáveis pela desnitrificação nos nódulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da Cultura da Soja

A soja foi introduzida no Brasil em 1882 vinda dos EUA, porém seu cultivo até 1980 foi restrito à região Sul do Brasil por se tratar de cultivares adaptadas a clima temperado. A expansão da soja para a região do Cerrado foi possível graças ao desenvolvimento de cultivares adaptadas a baixas latitudes, pois estas novas cultivares são menos sensíveis a variações do fotoperíodo. Além disso, o desenvolvimento de pesquisas de manejo da fertilidade do solo tornou possível o cultivo nos solos ácidos e pobres do Cerrado. Nos anos 90, a soja avançou em direção ao centro norte do país e, nos anos 2000, expandiu-se para o norte do país (CATTELAN; DALL'AGNOL, 2018).

Atualmente, os principais países produtores de soja são Brasil, Estados Unidos, China e Argentina, dos quais o Brasil é responsável por 50% da produção mundial. No Brasil, a soja é cultivada em mais de 38,5 milhões de hectares, com uma produção de 135,9 milhões de toneladas na safra 2020/2021. Esta cultura é a mais importante do país, tanto pela área plantada e volume de produção, como também pelo grande volume de exportações, que foi de 74,1 milhões de toneladas em 2020 (CONAB, 2021).

Dentre os fatores que fazem com que a soja seja uma das principais culturas agrícolas no mundo é o seu alto valor nutricional, composto principalmente por 40% de proteína e 20% de óleo (BONATO et al., 2000). Por essas características apresenta alta demanda de nitrogênio, estudos estimam que para produzir 3.000 kg de grãos de soja por hectare são necessários 240 kg de N, dos quais 195 kg são retirados da lavoura pelos grãos (HUNGRIA et al., 2001). A maioria dos solos brasileiros apresentam baixa disponibilidade de N, portanto a produção de soja sem uso de N-fertilizante apenas é possível graças à contribuição da FBN, através da inoculação com bactérias diazotróficas selecionadas. Este processo é capaz de suprir as necessidades de N da planta, fazendo com que a soja brasileira se torne competitiva no mercado externo (HUNGRIA et al., 1994, 1999; HUNGRIA et al., 1997; URQUIAGA et al., 2018). Ensaio relacionados ao cultivo de soja com manejo intensificado e alto nível tecnológico apontam rendimentos superiores a 6.800 kg ha⁻¹, com estimativa de 380 kg de N exportado nos grãos, indicando que a FBN é capaz de suprir a demanda de N mesmo que se duplique a atual produtividade média de grãos (URQUIAGA et al., 2018). Em geral, um levantamento realizado no Brasil indica que a dependência do N da soja derivado da FBN varia entre 69 a 94% (HUNGRIA et al., 2005a).

2.2 Bactérias Diazotróficas Utilizadas como Inoculantes da Soja no Brasil

Os primeiros ensaios de melhoramento da soja no Brasil foram realizados com inoculação das sementes e sem aplicação de N-fertilizante, considerando que as primeiras variedades introduzidas no Brasil tinham a capacidade de fixar N, dentre as diversas avaliações realizadas, uma delas era de nodulação. Em 1950 foi iniciada no Rio Grande do Sul pela atual FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) pesquisas para a seleção de estirpes e a produção de inoculantes, principalmente para soja, as quais eram depositadas na coleção SEMIA (seção de microbiologia agrícola). De 1968 a 1975 a estirpe SEMIA 587 isolada pela FEPAGRO na região de Santa Rosa-RS, passou a ser recomendada como inoculante de soja. Em 1979, a SEMIA 587 voltou a ser recomendada, juntamente com a SEMIA 5019 (=29W), isolada na atual Embrapa Agrobiologia, ambas estirpes classificadas como *Bradyrhizobium elkanii*. A partir de 1992, foram recomendadas mais duas estirpes, a SEMIA 5079 (=CPAC 15) e a SEMIA 5080 (=CPAC 7), provenientes da atual Embrapa Cerrados, ambas classificadas como *Bradyrhizobium japonicum* (FREIRE; VERNETTI, 1999). Atualmente, a SEMIA 5080

foi reclassificada como *Bradyrhizobium diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013). Estas duas estirpes são as mais utilizadas pelos agricultores na região do Cerrado, principal região produtora de soja do Brasil (HUNGRIA; MENDES, 2015).

Atualmente, estima-se que os inoculantes de soja a base de *Bradyrhizobium* spp. sejam aplicados nos quase 37 milhões de hectares cultivados no Brasil. As quatro estirpes recomendadas são utilizadas sozinhas ou em combinação, sendo comercializadas no Brasil mais 70 milhões de doses anualmente (SANTOS et al., 2019).

A economia de N-fertilizante alcançada pela FBN no Brasil excede os 12 milhões de toneladas de N mineral por ano, avaliado em mais de US \$ 13 bilhões (HUNGRIA; MENDES, 2015; SANTOS et al., 2019; ZILLI et al., 2019). Além dos benefícios econômicos, o uso de bactérias diazotróficas como inoculantes das culturas é uma política incentivada pelo governo federal por mitigar as emissões de gases de efeito estufa (BRASIL, 2012).

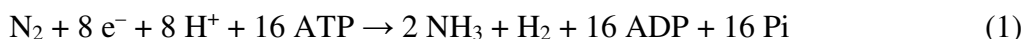
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Bactérias diazotróficas são membros da ordem bacteriana *Rhizobiales* da classe α -Proteobacteria que têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N_2), através da simbiose com raízes de leguminosas, ou em vida livre (SÁNCHEZ et al., 2011).

A percepção de que os exsudatos radiculares das leguminosas desencadeiam a produção de sinais do fator nodal rizobial, que por sua vez são reconhecidos por receptores das plantas. Toda essa sinalização levará à formação de nódulos radiculares, dentro dos quais as bactérias se diferenciam formando bacteroides (OLDROYD; DOWNIE, 2008). Estas são as células bacterianas especializadas em fixar N_2 e converter em NH_3 , que é usado pela planta para a síntese de aminoácidos e proteínas (POOLE et al., 2018).

Na FBN, é a enzima nitrogenase que catalisa as reações por possuir sítios que facilitam as trocas de alta energia dos elétrons. A nitrogenase é um complexo enzimático capaz de catalisar a redução de N_2 a amônia (NH_3), sendo composta por dois componentes que são nomeados de acordo com a sua composição metálica, o componente dimérico menor conhecido como ferro proteína (Fe) (dinitrogenase redutase), que recebe elétrons da ferredoxina e hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP) reduzindo o componente heterotetramérico maior, conhecido como proteína ferro-molibdênio (FeMo) (dinitrogenase), que contém o sítio catalítico da enzima, reduzindo diretamente o N_2 a NH_3 (DIXON; KAHN, 2004; CHERKASOV et al., 2015).

Pelo menos dois ATP são necessários para cada transferência de elétrons, assim, pelo menos 16 ATP são necessários para fixar uma única molécula de N_2 , de acordo com a Equação 1 (BURRIS et al., 1993; HOFFMAN et al., 2013; IGARASHI et al., 2003; DIXON; KAHN, 2004). Seis dos oito elétrons reduzem o N_2 , enquanto os outros dois produzem um subproduto inevitável, o hidrogênio (CHERKASOV et al., 2015).



Cerca de 25 a 60% da energia fornecida para a nitrogenase é utilizado para a formação de H_2 , porém alguns rizóbios, contém a enzima hidrogenase que é capaz de clivar o H_2 formado e gerar elétrons para a redução do N_2 , aumentando a eficiência da FBN (TAIZ; ZHANG, 2017). As hidrogenases provavelmente evoluíram antes do processo de fixação de N_2 , quando a atmosfera terrestre tinha uma concentração mais elevada de H_2 , fazendo com que parte dos microrganismos desenvolvessem a capacidade de usar o H_2 como fonte de energia (VIGNAIS; BILLOUD, 2007).

2.4 Mecanismo Bioquímico da Respiração Aeróbica e Desnitrificação

Assim como na respiração aeróbica, a cadeia de reação da desnitrificação é dividida entre o compartimento periplasmático e citoplasmático, e permite a geração de uma força próton-motriz através da membrana bacteriana, que é explorada para a síntese de ATP (KRAFT et al., 2011).

A desnitrificação e a respiração aeróbica dependem do mesmo maquinário respiratório, que consiste na desidrogenase do NADH (complexo I), o “pool de quinonas”, o complexo bc₁ (complexo III) e o citocromo c. Além disso, todos os desnitrificadores também são capazes de realizar a respiração aeróbica (CHEN; STROUS, 2013). Assim, é possível especular que os componentes da construção do processo de desnitrificação foram utilizados e/ou rearranjados, dando origem à evolução do sistema respiratório aeróbico em um momento em que a concentração de oxigênio (O₂) na atmosfera da Terra aumentou como resultado da atividade fotossintética (CASTRESANA; SARASTE, 1995; DUCLUZEAU et al., 2009).

O complexo bacteriano I da respiração aeróbica consiste em uma estrutura de até 14 subunidades, codificada pelos genes *nuo*ABCDEFGHIJKLMN (YIP et al., 2011; YAGI; MATSUNO-YAGI, 2003). Os elétrons são transportados a partir do NADH para a flavina mononucleotídeo (FMN), que segue por grupos de ferro-enxofre e, finalmente, alcança o “pool de quinona” (SAZANOV et al., 2006). Esse transporte de elétrons causa uma mudança conformacional na membrana do complexo I levando à translocação de quatro prótons sobre a membrana celular por par de elétrons e a redução das quinonas leva à remoção de dois prótons do citoplasma liberando-os no periplasma (EFREMOV et al., 2010; HUNTE et al., 2010; MITCHELL, 1975).

O complexo bc₁ (complexo III) transmite os elétrons das quinonas para dentro da membrana do citocromo c no periplasma (BERRY et al., 2000). E na oxidase terminal (complexo IV), os elétrons do citocromo c ou das quinonas são transferidos para o O₂. A oxidase terminal são proteínas integrais de membrana que reduzem O₂ em um centro ativo binuclear composto por uma heme de alta rotação (a₃, o₃ ou b₃) e um íon de cobre (CuB). Os quatro prótons necessários para a redução do O₂ para água (H₂O) são extraídos do citoplasma e contribuem para a força motriz de prótons (IWATA et al., 1995; SVENSSON-EK et al., 2002).

Na desnitrificação, a redutase do nitrato atua como um complexo enzimático que catalisa o primeiro passo da desnitrificação, que é a redução do NO₃⁻ a NO₂⁻. Esta enzima pode estar localizada no citoplasma (*nar*) ou no periplasma (*nap*) (RICHARDSON et al., 2001). No caso da *nar* mais energia é gerada devido o consumo adicional de prótons no citoplasma (BERTERO et al., 2003), enquanto que, na *nap* a energia só é conservada pela ação do complexo I (RICHARDSON et al., 2000; SIMON et al., 2008).

Os sensores principais para efetuar a mudança da respiração aeróbica para desnitrificação são proteínas que regulam a transcrição de genes em resposta a fatores ambientais, como uma proteína de ligação ao DNA sensível ao O₂, chamada FNR que mede o nível decrescente de O₂ usando um grupo ferro-enxofre (RICHARDSON et al., 2009).

Quando a proteína reguladora FNR detecta uma baixa concentração de O₂, outro sensor do nitrato detecta a presença de NO₃⁻ no periplasma e, para a redução do NO₃⁻ do lado citoplasmático da membrana, é ativado o transporte do NO₃⁻ através de transportadores *narK1*, em seguida os elétrons do “pool de quinona” são retransmitidos para o sítio ativo da enzima por uma série de aglomerados de ferro-enxofre (COELHO et al., 2011; NAJMUDIN et al., 2008), que reduz o NO₃⁻ a NO₂⁻, que volta ao periplasma via transportadores *narK2* (MOIR; WOOD, 2001; WOOD et al., 2002).

No espaço periplasmático, duas enzimas não homólogas catalisam a redução do NO₂⁻ em NO: a redutase do nitrito *cd1* codificado por *nirS*, e a cobre redutase do nitrito codificada por *nirK*. Por sua vez, o citocromo c e/ou pequenas proteínas de cobre como a pseudoazurin

(Paz) podem servir como doadores de elétrons para ambas as enzimas (SHAPLEIGH et al., 2006; MOIR et al., 1993; KOUTNY et al., 1999). Na sequência as duas moléculas de óxido nítrico são combinadas e reduzidas pela óxido nítrico redutase (*nor*) formando N_2O , sendo os elétrons originados das quinonas (HINO et al., 2012; FIELD et al., 2011).

O passo final da desnitrificação, é a redução do N_2O em N_2 realizada pela óxido nitroso redutase (*nos*), que aceita elétrons do citocromo c ou do “pool de quinonas”. A enzima contém dois centros de cobre (CuA e CuZ) e os elétrons são transmitidos do primeiro para o segundo, onde a redução do N_2O realmente ocorre, o CuZ contém quatro átomos de cobre ligados por dois átomos de enxofre, e é inativado pelo O_2 (POMOWSKI et al., 2011). A cada reação de redução ocorre a formação de uma molécula de H_2O (RICHARDSON et al., 2009).

A desnitrificação e respiração aeróbica podem se combinar em uma única cadeia respiratória híbrida, em que o óxido nítrico é dismutado em oxigênio e nitrogênio, e a parte final da cadeia prossegue aerobicamente via complexo IV (CHEN; STROUS, 2013; ETTWIG et al., 2010).

Do ponto de vista energético, o O_2 é um receptor de elétrons melhor que o NO_3^- , tanto por razões bioenergéticas como cinéticas. A cada par de elétrons liberados da respiração aeróbica, quatro prótons são translocados no complexo I, dois prótons são translocados durante a redução e re-oxidação das quinonas (no complexo III ou IV) e quatro prótons são translocados pelo complexo IV. No total, até dez prótons são translocados através da membrana, que forma uma força motriz de prótons para gerar ATP. Na desnitrificação, no máximo seis prótons são translocados por par de elétrons se o NADH for usado como doador de elétrons (CHEN; STROUS, 2013).

Até mesmo a redutase do óxido nítrico, que pode ser considerado como uma forma de complexo IV não contribui para a força motriz de prótons. Isso é causado pelo fato de que, apesar do alto potencial do NO o sítio ativo da redutase do óxido nítrico é uma base muito fraca para “puxar” os prótons do citoplasma (FLOCK et al., 2012).

A maior parte da energia é perdida na parte final da via de desnitrificação, onde os aceitadores de elétrons de alto potencial NO e N_2O não contribuem para gerar força próton-motriz. Do ponto de vista do organismo, não importa se reduz o NO_3^- a NO_2^- ou N_2O a N_2 , a quantidade de energia gerada é igual. Quando os desnitrificadores são capazes de fazer a dismutação do NO, a quantidade de energia gerada aumenta. Nesse caso, 7,3 prótons são translocados por par de elétrons (CHEN; STROUS, 2013).

2.5 Relação entre o Processo de FBN e a Desnitrificação

A eficiência energética da FBN pode ser estimada a partir da respiração celular, em que a oxidação de uma molécula de glicose produz até 36 ATPs, e a respiração anaeróbica (desnitrificação) produz uma quantidade significativamente inferior de ATP, fazendo diminuir o desempenho da FBN (CHERKASOV et al., 2015; DELGADO et al., 2007; STROHM et al., 2007).

O oxigênio é necessário para a respiração dos bacteroides, porém por ser um forte aceptor de elétrons pode danificar irreversivelmente a nitrogenase. Assim, para manter uma condição microaerofílica no interior dos nódulos, ocorre o controle do fluxo de O_2 através de uma barreira de difusão no córtex nodular, e pela presença da leghemoglobina que atua transportando o O_2 em baixas concentrações no nódulo (10-50 nM O_2) (DOWNIE, 2005; MINCHIN et al., 2008; PREISIG et al., 1993).

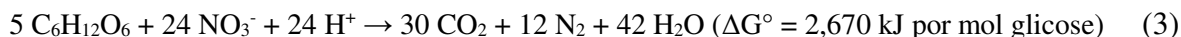
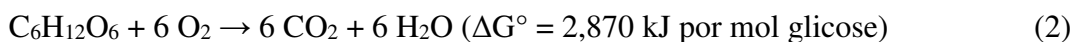
Em condição de anaerobiose ocorre a desnitrificação que não é governada pelo processo da FBN, mas é o resultado de uma estratégia de sobrevivência, principalmente durante períodos de insuficiência de O_2 (ZABLOTOWICZ; FOCHT, 1979; ZHONG et al., 2009). Em teoria, os

processos de FBN e desnitrificação devem ocorrer espacial e temporalmente separados, dadas as distintas disponibilidades de O₂ requeridas (SAITO et al., 2014).

Os pré-requisitos definidos para a desnitrificação são condições de anaerobiose, a presença de NO₃⁻ como aceptor de elétrons, e disponibilidade de carbono utilizado como fonte de energia para o processo. Em solos de zonas húmidas as condições anóxicas predominam, e as demandas químicas e microbianas de O₂ excedem a sua oferta, pois a difusão de O₂ na água é de cerca de 10⁴ vezes mais lenta do que no ar (LUCINSKI et al., 2002).

Portanto, quando os solos são alagados o metabolismo microbiano e o equilíbrio dos elementos e compostos são alterados, desencadeando uma série de transformações, principalmente, químicas e microbiológicas que levam a um novo estado de equilíbrio (GONÇALVES et al., 2008). Nesse ambiente, os microrganismos anaeróbicos, que utilizam os compostos oxidados do solo como receptores de elétrons na respiração apresentam a seguinte sequência de transferência de elétrons de acordo com o potencial de oxirredução (Eh): o primeiro aceptor é o NO₃⁻ (Eh = 200 a 400 mV); óxido de manganês (MnO₂) (Eh = 200 a 300 mV); hidróxido de ferro (Fe(OH)₂) (Eh = 200 a -100 mV); sulfato (SO₄⁻²) (Eh = < -200 mV) e por último o carbono (CH₂O)_n, sendo reduzidos, respectivamente, a N₂, Mn⁺², Fe⁺², sulfeto e metano (PONNAMPERUMA, 1972). Essas moléculas têm um potencial de redução menor que o oxigênio (VAN SPANNING et al., 2007).

Em geral as proteínas necessárias para a desnitrificação são produzidas apenas sob condições anaeróbicas, e se células crescidas anaerobicamente forem expostas ao O₂, então as atividades das proteínas são inibidas (VAN SPANNING et al., 2007). A desnitrificação do NO₃⁻ é considerado o sistema respiratório de maior rendimento energético em ambientes anaeróbicos, após o consumo de oxigênio. A energia livre é 7% inferior à respiração aeróbica, porém a síntese de ATP na desnitrificação é muito menor. A seguir são apresentadas as Equações da respiração aeróbica (2) e desnitrificação (3), respectivamente (STROHM et al., 2007):



Com vimos, a FBN é um processo que demanda grandes quantidades de energia, e que a fonte de ATP utilizada é advinda da respiração celular em condição de ambiente aeróbico (PAJARES; BOHANNAN, 2016), porém, em condições anóxicas na zona rizosférica, ocorre a respiração anaeróbica em que bactérias diazotróficas capazes de desnitrificar utilizam como aceptores finais de elétrons os óxidos de nitrogênio, como o NO₃⁻ (KLOOS et al., 2001; INABA et al., 2012; ITAKURA et al., 2013; BEDMAR et al., 2013). Os ATP gerados na desnitrificação são utilizados como fonte de energia para a continuidade da FBN em leguminosas, mantendo o funcionamento dos bacteroides dentro do nódulo (DELGADO et al., 2007). A desnitrificação permite que as bactérias sobrevivam e se multipliquem no interior dos nódulos, como também em vida livre (ZUMFT, 1997; SIMON et al., 2008).

Os dados apresentados demonstram que a fixação de N₂ e a desnitrificação, dois processos que são antagônicas no ciclo do nitrogênio, tem funções complementares nas células de bactérias diazotróficas (LUCINSKI et al., 2002).

2.5.1 Desnitrificação como mecanismo de desintoxicação nos nódulos

As bactérias que são capazes de desnitrificar aumentam sua flexibilidade metabólica, pois permitem elas crescerem na ausência de O₂. Por outro lado, existe o risco potencial que as concentrações livres dos intermediários tóxicos, como NO₂⁻ e NO, atinjam níveis que são letais para a célula (KATO et al., 2010; SASAKURA et al., 2006; SÁNCHEZ et al., 2010; SHIMODA

et al., 2009). Devido à ordem sequencial de reações durante a desnitrificação, os produtos da reação são substratos para a próxima enzima até chegar em N_2 , porém nem todas as bactérias apresentam todo o conjunto de genes ligados à desnitrificação, podendo ocorrer o acúmulo destes compostos em alguma situação (VAN SPANNING et al., 2005; RICHARDSON et al., 2009).

O NO_2^- e o NO inibem significativamente a atividade da nitrogenase nos bacteroides (CASELLA et al., 1988; KATO et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2010; SALAS et al., 2020). A presença da leghemoglobina (Lb) ligada ao NO_2^- ou NO dentro dos nódulos de soja formam o complexo nitrosileghemoglobina (NO-Lb), que pode funcionar como um mecanismo para prevenir a inibição da nitrogenase. Mesmo assim, o acúmulo de NO-Lb pode resultar na inibição de atividade da nitrogenase, já que a ligação do NO a Lb pode inibir competitivamente a ligação com o O_2 , diminuindo assim a oferta de O_2 disponível para os bacteroides, reduzindo a fixação de N_2 (MATHIEU et al., 1998).

Foram observados que a diminuição na produção de NO em nódulos resulta no aumento nas taxas de N_2 fixado (SHIMODA et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2010; TOMINAGA et al., 2010). A atividade da nitrogenase e a expressão dos genes *nifH* e *nifD*, que codificam as proteínas Fe e FeMo, respectivamente, foram afetadas em nódulos produzidos por *B. japonicum* sem óxido nítrico redutase, que acumula o NO produzido através da desnitrificação, mas a nitrogenase não foi afetada por um mutante deficiente da nitrito redutase respiratória, onde a produção de NO_2^- pela desnitrificação estava bloqueada (SÁNCHEZ et al., 2010).

O efeito negativo do NO sobre a nitrogenase é evitado quando o *B. diazoefficiens* é inoculado em plantas de soja, devido a expressão do gene *norC*, conferindo assim a proteção da fixação de N_2 durante períodos de alagamento (SALAS et al., 2020).

2.6 Desnitrificação das Estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Inoculadas na Soja

Os desnitrificadores são encontrados entre bactérias, archaea e eucariotos. No entanto, até agora a maioria dos organismos desnitrificantes isolados e estudados pertencem ao filo das proteobactérias (Alpha, Beta e Gamma) (CABELLO et al., 2004; HEYLEN et al., 2006; HAYATSU et al., 2008; JONES et al., 2008; KERN; SIMON, 2009; RISGAARD-PETERSEN et al., 2006; GREEN et al., 2010). Entre as bactérias fixadoras de N_2 , a capacidade de desnitrificação tem sido indicada em vários gêneros: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Glucoacetobacter*, entre outros (ISOLDI; KOETZ, 2004).

Na Tabela 1 são apresentados os genes de desnitrificação presentes no genoma das quatro bactérias recomendadas para inoculação da soja no Brasil, como também a presença ou ausência de atividade da hidrogenase (BODDEY; HUNGRIA, 1997; ZILLI et al., 2019).

Tabela 1. Genes de desnitrificação no genoma de bactérias usadas como inoculantes na soja, identificados usando Genomas Microbianos Integrados (IMG) (<https://img.jgi.doe.gov/>) e o serviço de anotação de genomas procarióticos baseados em RAST/SEED (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).

Estirpes	Espécies	Número de acesso NCBI	Hup	Grupo de genes de redutase desnitrificantes no genoma
CPAC 7	<i>B. diazoefficiens</i>	ADOU000000000.2	+	15 genes - <i>narA</i> , <i>nirV</i> , <i>nirK</i> , <i>norD</i> , <i>norQ</i> , <i>norB</i> , <i>norC</i> , <i>norE</i> , <i>nosX</i> , <i>nosL</i> , <i>nosY</i> , <i>nosF</i> , <i>nosD</i> , <i>nosZ</i> , <i>nosR</i>
CPAC 15	<i>B. japonicum</i>	CP007569.1	-	7 genes - <i>napA</i> , <i>nirV</i> , <i>nirK</i> , <i>norD</i> , <i>norQ</i> , <i>norB</i> , <i>norC</i> , <i>norF</i> , <i>norE</i>
29 W	<i>B. elkanii</i>	NZ_SEMA01000000	-	5 genes - <i>narK</i> , <i>narG</i> , <i>narH</i> , <i>narJ</i> , <i>narI</i>
SEMIA 587	<i>B. elkanii</i>	AJJK000000000.1	-	4 genes - <i>narG</i> , <i>narH</i> , <i>narJ</i> , <i>narI</i>

Os quatro principais genes necessários para a desnitrificação estão em negrito; atividade da hidrogenase (Hup): ativa (+), ausente (-). (Adaptado de ZILLI et al., 2019; BODDEY; HUNGRIA, 1997).

Entre as estirpes de bactérias utilizadas como inoculantes da soja no Brasil, o *B. diazoefficiens* (CPAC 7) é uma fixadora de N₂ de crescimento lento, e única bactéria que possui atividade da enzima hidrogenase (Hup⁺), como também a que apresenta todos os genes capazes de codificar as enzimas necessárias para a desnitrificação completa. Nesta estirpe, a desnitrificação depende dos genes *narA*, *nirVK*, *norDQBC*, e *nosXLYFDZR* codificadores de nitrato, nitrito, óxido nítrico e óxido nitroso redutase, respectivamente. Enquanto, a estirpe *B. japonicum* (CPAC 15) possui o conjunto de genes suficientes para a redução até o N₂O, que são *napA*, *nirVK*, *norDQBCFE*. Já as estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e 29W) não têm capacidade de produzir óxidos de N através da desnitrificação, já que estas estirpes carecem dos genes que codificam a subunidade catalítica das redutases desnitrificantes (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a; ZILLI et al., 2019). Dada a filogenia dos genes de desnitrificação, é possível que alguns gêneros de α -Proteobacteria perderam os genes de desnitrificação durante o processo de evolução, como a *B. japonicum* perdeu o gene *nos*, e os *B. elkanii* que perderam o *nir*, *nor* e *nos* (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a).

2.7 Influência Direta da FBN nas Emissões de N₂O pela Simbiose com Estirpes de *Bradyrhizobium* spp. na Soja

Bactérias capazes de realizar a desnitrificação completa, isto é, a conversão de NO₃⁻ até N₂ são escassas (UCHIDA; AKIYAMA, 2013). A maioria delas não possuem, ou não expressam o conjunto completo de enzimas necessárias para realizar cada uma das etapas da desnitrificação (BEDMAR et al., 2005). De 250 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isolados de nódulos de soja cultivados na Argentina, apenas 41 foram considerados verdadeiros desnitrificadores (FERNÁNDEZ et al., 2008). A maioria das espécies de rizóbios analisadas até agora contém *nap*, a localização desta enzima no periplasma pode ser uma adaptação evolutiva para proteger a nitrogenase dos danos produzidos pelos óxidos de nitrogênio (DELGADO et al., 2007).

Experimentos em cultura pura com adição de NO₃⁻ mostraram que estirpes de bactérias fixadoras de N₂ sem o gene *nosZ* produziu N₂O, enquanto bactérias com o gene *nosZ* foi capaz de reduzir NO₃⁻ até N₂ (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006b). Raízes de soja noduladas com

Bradyrhizobium spp. que tem *nosZ* pode utilizar NO_3^- fornecido externamente para produzir N_2 (HIRAYAMA et al., 2011). A presença deste gene tem o potencial de reduzir não só o N_2O derivado da decomposição dos nódulos, mas também N_2O derivado de N-fertilizantes (INABA et al., 2012).

Os resultados de Itakura et al. (2013) com mutantes de linhagens de *B. japonicum*, atual *B. diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013) com atividade da óxido nitroso redutase aumentada (*nosZ*⁺⁺) mostraram que a inoculação da estirpe com *nosZ*⁺⁺ reduziu as emissões de N_2O na pós-colheita em 43 e 54% na área do lisímetro e campo, respectivamente. Ambos estudos foram conduzidos em Andossolo com 98% das estirpes de *Bradyrhizobium* do tipo selvagem sem o gene *nosZ* (controle). No entanto, dentro da escala de laboratório, a estirpe *nosZ*⁺⁺ mostrou claramente maior potencial de redução de N_2O mesmo quando comparado a estirpe não mutante com gene *nosZ*⁺ (ITAKURA et al., 2013). Em condições anaeróbicas ocorre um aumento da produção de N_2O pelos nódulos radiculares, especialmente quando as plantas de soja foram inoculadas com mutantes sem *nosZ* (TORTOSA et al., 2015).

Após a senescência das plantas os bacteroides presentes nos nódulos podem se diferenciar e serem liberados no solo para sobreviver saprofiticamente (KONDOROSI et al., 2013). Mesmo em condições de vida livre, as bactérias diazotróficas e desnitrificantes utilizam o NO_3^- como aceitador final de elétrons sob condições de restrição de O_2 (GARCIA-PLAZAOLA et al., 1993). A inoculação de bactérias no cultivo de leguminosas podem aumentar certos grupos de bactérias no solo, Zilli et al. (2013) estimou uma população de 10^5 células por grama de solo logo após a colheita da soja.

O produto final da desnitrificação por *Bradyrhizobium* spp. varia com a linhagem estudada (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a). Esses nódulos de soja poderiam eliminar N_2O no solo e, assim, diminuir a emissão de N_2O dos campos de soja para a atmosfera (HÉNAULT; REVELLIN, 2011).

2.7.1 Influência da atividade da hidrogenase nas emissões de N_2O

A maioria das estirpes de rizóbios parecem não ter a enzima hidrogenase (Hup^-), ou ter baixa atividade Hup (URATSU et al., 1982; BAGINSKY et al., 2002). Nestas situações, o H_2 se difunde para fora do nódulo no solo, tem sido calculado que para cada hectare são produzidos cerca de 5.000 litros de H_2 por dia durante pico de crescimento, representando 240.000 L de H_2 ao longo de toda época de crescimento para uma cultura de leguminosa fixando 200 kg N ha^{-1} (DONG et al., 2003).

Apesar das altas taxas de liberação de H_2 dos nódulos, pouco ou nenhum H_2 sai da superfície do solo (CONRAD; SEILER, 1979), a maior parte é oxidado dentro de alguns centímetros de distância dos nódulos (LA FAVRE; FOCHT, 1983). A rápida oxidação do H_2 está associada à fixação de CO_2 no solo (DONG; LAYZELL, 2001; STEIN et al., 2005), e ao aumento na biomassa microbiana (POPELIER et al., 1985).

Quando H_2 é oxidado, 60% dos elétrons produzidos são utilizados no consumo de O_2 e 40% na fixação de CO_2 (DONG; LAYZELL, 2001). O H_2 é oxidado pela hidrogenase que doa elétrons em uma cadeia respiratória terminada por O_2 fornecendo energia para processos celulares e assimilação de CO_2 (GRAHAM et al., 2011). Culturas de leguminosas têm a capacidade de aumentar o estoque de carbono do solo (HUSSAIN et al., 1988), conseguido em parte devido a notável fixação de CO_2 observada nos solos expostos ao H_2 (DONG; LAYZELL, 2001).

A captação aprimorada de O_2 em solos expostos ao H_2 pode criar um ambiente anaeróbio em torno dos nódulos liberadores de H_2 , promovendo o processo da desnitrificação, levando à produção de N_2O (SAHRAWAT; KEENEY, 1986; FLYNN et al., 2014). Também foi demonstrado que vários oxidantes de H_2 contêm genes nitrificantes e desnitrificantes (FLYNN

et al., 2014). Isso pode explicar as mudanças que são vistas nas concentrações de H_2 , CO_2 , O_2 e N_2O do solo exposto ao H_2 (DONG; LAYZELL, 2001).

O número de cópias do gene *nirK* foi maior em solos tratados com H_2 indicando que o aumento na produção de N_2O foi devido ao processo de desnitrificação, e o solo analisado próximo aos nódulos apresentaram maiores taxas de emissão de N_2O em relação ao solo distante dos nódulos (ZHANG et al., 2009).

Este aumento nas emissões de N_2O causado pelas estirpes sem atividade de hidrogenase (Hup^-), poderiam ser minimizados com o uso de estirpes com hidrogenase ativa (Hup^+) que produzem menos H_2 reduzindo a estimulação realizada pelo H_2 aos microrganismos desnitrificadores (FLYNN et al., 2014; ZILLI et al., 2019).

2.8 Influência Indireta da FBN nas Emissões de N_2O pela Decomposição de Resíduos da Soja

A fixação de biológica de N_2 afeta indiretamente as emissões de N_2O por inserir formas de N que podem sofrer nitrificação e desnitrificação nos solos (UCHIDA; AKIYAMA, 2013; ZILLI et al., 2019). Além de hospedar bactérias diazotróficas capazes de desnitrificar, a soja produz resíduos de baixa relação C/N que são prontamente decompostos com a liberação de grandes quantidades de N mineral no solo (SHAH, 2014), sendo o NO_3^- encontrado em maior proporção nos solos cultivados com soja representando entre 60 e 70% do total de N-inorgânico (SIQUEIRA NETO et al., 2011), a disponibilidade do NO_3^- e C orgânico no solo fornecidos pela decomposição dos resíduos, juntamente com a restrição de O_2 geram as condições necessárias para a desnitrificação (ROCHETTE; JANZEN, 2005; CHEN et al., 2013), aumentando o potencial de produção de N_2O (BAGGS et al., 2000; INABA et al., 2009). Esse processo pode ser realizado por microrganismos do solo ou também pelos rizóbios inoculados, desde que eles abriguem os genes necessários (INABA et al., 2012).

A decomposição do nódulo no final do ciclo da soja foi indicada como a principal fonte de N_2O derivado de N fixado dos nódulos (INABA et al., 2009; ITAKURA et al., 2013). Aproximadamente de 68 a 94% da emissão total de N_2O atribuída ao ciclo completo da soja ocorreram durante o período de formação dos grãos até a maturação, que compõem somente 11% do ciclo de vida da planta (YANG; CAI, 2005; CIAMPITTI et al., 2008).

Durante o ciclo da cultura da soja ocorrem baixas emissões de N_2O durante os primeiros estágios da cultura, sugerindo que foram os baixos níveis de NO_3^- que não favoreceram as emissões, devido à grande absorção de N que ocorre nas fases iniciais de crescimento das plantas, mesmo em condições ótimas para a emissão de N_2O (CIAMPITTI et al., 2008).

Assim, a fixação de N_2 pode influenciar diretamente a produção de N_2O em sistemas agrícolas por microrganismos diazotróficos associados à planta ou como saprófitas no solo, como também indiretamente pelo aumento da concentração de N no solo, ou mesmo, estimulando outros desnitrificadores (ZILLI et al., 2019).

2.9 Fator de Emissão do N_2O na Cultura da Soja

Os estudos sobre o fluxo de gases passaram a ter destaque devido à necessidade de quantificar as emissões de gases de efeito estufa pela decomposição dos resíduos culturais da soja (SIQUEIRA NETO et al., 2011). Em uma visão mais geral do sistema de produção, a maior fonte de GEE na produção de soja é a decomposição de resíduos culturais (36%), seguido de uso de combustível (19%), aplicação de fertilizantes (16%), calagem (13%), pesticidas (7%), sementes (8%), e eletricidade consumida nas fazendas (<1%) (RAUCCI et al., 2015).

O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) nas diretrizes de 1997 atribuiu um fator de emissão de 1,25% para o N_2O emitido a partir da FBN para as culturas de

leguminosas (IPCC, 1997). Porém, após a revisão de diversos trabalhos que avaliaram a emissão de N_2O na cultura da soja em condições de campo, a FBN foi excluída como uma fonte direta de N_2O na última diretriz do IPCC para inventários de N_2O , apontando que as emissões de N_2O derivadas da FBN não eram significativas para as culturas de leguminosas, porque foi considerado que não haviam provas científicas suficientes para incluir a FBN como fonte de N_2O . Em vez disso, foi recomendado que as emissões de N_2O das leguminosas fossem consideradas com base na decomposição do resíduo da colheita (ROCHETTE; JANZEN, 2005; IPCC, 2006).

Ainda assim, tem-se adotado o fator de emissão de 1%, que é o mesmo utilizado para fertilizantes sintéticos, para mensurar a emissão de N_2O pela decomposição de resíduos de leguminosas e não leguminosas (IPCC, 2006). Apesar disso, ainda há discussão sobre a real emissão de N_2O em leguminosas no campo, especialmente pela soja (COSENTINO et al., 2015).

Em nível global, a contribuição das leguminosas fixadoras de N_2 nas emissões de N_2O são mal documentados (SIQUEIRA et al., 2014). Na maioria dos estudos, as emissões de resíduos de soja foram analisadas no contexto de rotação de culturas ou diferentes sistemas de preparo do solo, tornando difícil atribuir as emissões de N_2O aos resíduos que permanecem no campo (RAUCCI et al., 2015). Além disso, os fatores de emissão utilizados para a elaboração dos inventários de emissão de N_2O são os obtidos em zonas de clima temperado e extrapolados para as zonas tropicais, o que não condiz com a realidade. Diante disso, são necessário estudos para definir e certificar fatores de emissão mais adequados para as condições brasileiras (ALVES et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos em campo na Estação Experimental da Embrapa Agrobiologia nos anos agrícolas de 2017/2018 (outubro de 2017 à julho de 2018) e 2020 (janeiro à agosto de 2020) em áreas diferentes, outro em casa de vegetação, entre os anos 2019 e 2020 (setembro de 2019 à março de 2020), utilizando a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e tendo a inoculação com estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* spp. como tratamentos. Além desses experimentos com plantas, também foi realizado um experimento *in vitro* com as estirpes utilizadas como inoculantes da soja.

O ensaio *in vitro* foi realizado para confirmar a capacidade de cada estirpe em desnitrificar. O ensaio em casa de vegetação, com condições mais controladas (solo homogêneo, controle de irrigação e dos resíduos deixados no sistema) foi realizado com foco principal nos efeitos das estirpes nas emissões de N₂O. E os estudos de campo foram caracterizar as emissões de N₂O na cultura da soja, incluindo o período pós-colheita, e verificar o desempenho das estirpes inoculadas para a produção de grãos, além de possíveis efeitos nas emissões de N₂O.

3.1 Delineamento Estatístico

O experimento *in vitro* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), enquanto os experimentos em casa de vegetação e em campo, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), com 5 repetições, sendo os tratamentos compostos pela inoculação da soja com quatro estirpes recomendadas para a cultura no Brasil, utilizadas individualmente. Dessa forma, os tratamentos foram: 1 - CPAC 7 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*); 2 - CPAC 15 (*Bradyrhizobium japonicum*); 3 - 29 W (*Bradyrhizobium elkanii*); 4 - SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*); 5 - tratamento Controle (sem bactéria); 6 - tratamento Solo (sem planta), no caso dos experimentos em casa de vegetação e campo. O experimento *in vitro* foi conduzido em frascos com cultura pura (Controle), e meio de cultura com as respectivas bactérias (inoculantes), comparados sob as condições com e sem acetileno.

Nos experimentos em campo cada parcela foi composta por oito linhas de plantio com espaçamento de 50 cm, nas dimensões de 4 m x 6 m, o tratamento Solo foi representado por câmaras instaladas ao redor do experimento.

3.2 Experimento In Vitro

Os tratamentos foram submetidos a condição com e sem acetileno, permitindo verificar se existe ou não maior produção de N₂O, devido a inibição causada a enzima óxido nitroso redutase (*nosZ*) pelo uso do acetileno (C₂H₂) (YOSHINARI; KNOWLES, 1976; SAMESHIMA-SAITO et al., 2004).

As bactérias foram fornecidas pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia, já crescidas e com colônias isoladas em meio 79 sólido (FRED; WAKSMAN, 1928). A produção do inoculante foi feita a partir dessas colônias, transferidas para um Erlenmeyer preenchido com 50 mL de meio 79 líquido (FRED; WAKSMAN, 1928), previamente esterilizado, e em seguida colocado para crescimento sob temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm em incubadora. Após atingirem densidade óptica (DO a 600 nm) entre 0,800 e 1 nm foram transferidos 3 mL do meio com cada uma das bactérias para 10 frascos de cromatografia de 20 mL, que receberam 0,5 mL de uma solução 10 mM de KNO₃ (nitrato de potássio). Em seguida, a atmosfera dos frascos (“headspace”) foi substituída por Argônio, a fim de criar um ambiente limitado em oxigênio. Em metade dos frascos, injetou-

se um volume de 0,5 mL de acetileno para produzir uma concentração próxima de 3% no headspace.

Após 4 horas de incubação em estufa a 30 °C foram coletados, com auxílio de uma seringa, 10 mL do gás de cada frasco. Em seguida, esse volume foi transferido para outro frasco de cromatografia de 10 mL, após a realização de vácuo. A concentração de N₂O produzida pelas bactérias foram determinadas por cromatografia gasosa com detecção de N₂O em detector de captura de elétrons.

As concentrações de N₂O nos frascos com e sem acetileno foram comparadas para cada estirpe de *Bradyrhizobium* spp., considerando-se que a maior concentração de N₂O nos frascos tratados com acetileno em comparação com os frascos sem acetileno indica a capacidade de reduzir N₂O até N₂.

3.3 Experimento em Casa de Vegetação

O experimento foi conduzido em vasos com 8 kg de solo em casa de vegetação (Figura 1) da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ.



Figura 1. Visão geral do experimento de soja sob inoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em casa de vegetação. Foto: Wadson de Menezes Santos.

O solo utilizado para o experimento foi oriundo de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletado na profundidade de 0 a 20 cm em área onde a soja nunca havia sido cultivada. Após secagem ao ar e peneiramento em malha de 8 mesh, retirou-se uma amostra composta para análises químicas, estes resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Características químicas do solo do experimento em casa de vegetação no município de Seropédica, RJ.

pH	⁽¹⁾ MO	Ca	Mg	Al	P	K
(H ₂ O)	- g kg ⁻¹ -	-----	cmol _c dm ⁻³ -----	-----	----- mg dm ⁻³ -----	-----
5,2	12,4	1,07	0,68	0,3	3,77	27,29

⁽¹⁾MO: matéria orgânica. Métodos de análise: pH (Potenciometria); MO (Colorimetria); Ca e Mg (Absorção atômica); P (Colorimétrico) e K (Fotometria de chama); Al (Titulação) (Embrapa, 1997).

Foi realizada a calagem dois meses antes do plantio, aplicando-se a dose equivalente a 1.000 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT = 80%). A adubação de plantio correspondeu a aplicação de 35 kg ha⁻¹ de P na forma de superfosfato simples, 50 kg ha⁻¹ de K na forma de

cloreto de potássio, e 50 kg ha⁻¹ de formulado de micronutrientes FTE BR12, utilizando-se como referência a recomendação do Manual de Calagem e Adubação do Estado do Rio de Janeiro (CAMPOS et al., 2013). Após a adubação o solo foi homogeneizado com auxílio em betoneira, e o volume de 6 litros do vaso foi preenchido com 8 kg de solo. Foi determinada a capacidade de campo do solo, com o intuito de poder controlar o grau de saturação dos poros do solo com água, que é uma variável de referência importante para as emissões de N₂O.

Os inoculantes de cada estirpe de *Bradyrhizobium* spp. foram obtidos no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia, produzido em veículo líquido, e continham aproximadamente 10⁹ UFC mL⁻¹.

As sementes da cultivar BRS 284 (tipo de crescimento indeterminado e grupo de maturação 6.3) foram inoculadas e semeadas no dia 20 de setembro de 2019 adicionando quatro sementes por vaso, e nove dias após a emergência foi realizado o desbaste deixando duas plantas por vaso. Para otimizar a FBN foram aplicados via foliar no estágio V3 o equivalente a 35 g ha⁻¹ de Mo, e 3,5 g ha⁻¹ de Co.

Devido a necessidade de realizar avaliações destrutivas como nodulação, fixação biológica de nitrogênio, acúmulo de nitrogênio na planta e o monitoramento do teor de nitrato, amônio e umidade do solo, foi adicionado mais um vaso por repetição.

Na ocasião do plantio da soja, também foram semeadas, com três repetições, as plantas testemunhas: feijão não nodulante (*Phaseolus vulgaris*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e milho (*Zea mays*) (Figura 2), as quais foram utilizadas como referência da abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível no solo, também foi determinado o $\delta^{15}\text{N}$ do solo sem planta.



Figura 2. Plantas não fixadoras de nitrogênio utilizadas como testemunhas no experimento em casa de vegetação.

3.4 Descrição das Áreas dos Experimentos em Campo

Os experimentos de campo (Figura 3) foram conduzidos na Estação Experimental da Embrapa Agrobiologia “Terraço” localizada no município de Seropédica (RJ), cujas coordenadas geográficas são 22°45' S, 43°40' W e altitude média de 26 m.



Figura 3. Visão geral do experimento de soja sob inoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. no experimento em campo 2020. Foto: Wadson de Menezes Santos.

O solo das áreas experimentais foi o Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (SANTOS et al., 2013), cuja condição de fertilidade, para cada um dos dois experimentos, é apresentada na Tabela 3. O tipo de clima da região, segundo a classificação de Köppen é Aw, com verão úmido e inverno seco, apresentando temperatura média de 24,6 °C e precipitação média de 1.300 mm por ano, sendo julho e agosto os meses mais secos. Foi utilizado nos experimentos um sistema de irrigação por aspersão para elevar a umidade do solo durante os estádios mais importantes do desenvolvimento da cultura, quando necessário. Durante o período experimental os dados de precipitação, temperatura e umidade relativa do ar foram registrados pela Estação Meteorológica Automática de Superfície da Ecologia Agrícola que localizada a um raio 1,8 km da área experimental, no município de Seropédica, RJ.

Tabela 3. Características químicas do solo na profundidade de 0-20 cm das áreas experimentais nos experimentos 2017/2018 e 2020 no município de Seropédica, RJ.

Safra	pH (H ₂ O)	⁽¹⁾ MO - g kg ⁻¹ -	Ca ----- cmol _c dm ⁻³ -----	Mg ----- cmol _c dm ⁻³ -----	Al -----	P ----- mg dm ⁻³ -----	K -----
2017/2018	5,8	14,1	3,66	0,48	⁽²⁾ ND	4,56	73,98
2020	5,3	18,9	2,26	1,14	0,09	3,51	44,32

⁽¹⁾MO: matéria orgânica; ⁽²⁾ND: não detectável. Métodos de análise: pH (Potenciometria); MO (Colorimetria); Ca e Mg (Absorção atômica); P (Colorimétrico) e K (Fotometria de chama); Al (Titulação) (Embrapa, 1997).

3.5 Implantação e Condução dos Experimentos em Campo

Para ambos os experimentos, a correção do solo das áreas experimentais foi realizada após a passagem da grade aradora e enxada rotativa, seguida da aplicação de 1.000 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT = 80%) e 500 kg ha⁻¹ de gesso agrícola, que foram incorporados a 20 cm por gradagem, sendo os plantios realizados após dois meses da correção do solo. No caso do experimento 2020, foi feito o plantio da cultura do milho em área total para extrair N do solo para tentar potencializar a nodulação da cultura da soja plantada em sucessão, e para permitir verificar a existência de áreas heterogêneas de forma a orientar o posicionamento das parcelas experimentais da soja.

Para o primeiro experimento, executado na safra 2017/2018, foi semeada manualmente no dia 30 de outubro de 2017 a cultivar de soja TMG 7062 IPRO (tipo de crescimento

semideterminado, grupo de maturação 6.2). Após a emergência, foi realizado o desbaste deixando uma população final de 400.000 plantas ha⁻¹.

No segundo experimento, antes do plantio da soja, realizou-se a semeadura manual do milho híbrido AG 1051 no dia 23 de agosto de 2019, com espaçamento de 60 cm entre linhas e com densidade de semeadura de 80.000 plantas ha⁻¹. Previamente no sulco de plantio, foram aplicados 35 kg ha⁻¹ de P na forma de superfosfato simples, e 33 kg ha⁻¹ de K na forma de cloreto de potássio. O milho foi colhido em 5 de novembro de 2019, com ensiladeira acoplada ao trator, sendo toda a parte aérea do milho retirada da área experimental. Após três meses da área em pousio, o solo foi preparado da mesma forma do experimento 2017/2018 com grade aradora, enxada rotativa, seguido da abertura dos sulcos de plantio. A soja foi semeada manualmente no dia 21 de janeiro de 2020, utilizando-se a cultivar M5917 IPRO (tipo de crescimento indeterminado e grupo de maturação 5.9), e após a emergência foi feito desbaste para uma população média de 220.000 plantas ha⁻¹. A adubação de plantio em ambos experimentos foi realizada no sulco de semeadura, aplicando-se 35 kg ha⁻¹ de P na forma de superfosfato simples, 33 e 50 kg ha⁻¹ de K como cloreto de potássio nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, e 50 kg ha⁻¹ do formulado de micronutrientes FTE BR12. As adubações do milho e da soja seguiram as recomendações do Manual de Calagem e Adubação do Estado do Rio de Janeiro (CAMPOS et al., 2013).

A inoculação foi realizada com inoculante turfoso com a aplicação de 5 mL de solução açucarada a 10% por kg de sementes de soja, seguida de homogeneização, e aplicação de 10 g do inoculante turfoso (tratamentos) por kg de sementes, com nova homogeneização, e deixada secar a sombra. No experimento de 2020 também foi realizada aplicação do inoculante líquido via pulverização no sulco de semeadura na dose de 30 mL kg⁻¹ de sementes. Os inoculantes continham aproximadamente 10⁹ células g⁻¹, e foram fornecidos pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia.

Para melhorar o desempenho da FBN foi aplicado no estádio V4 via foliar, o equivalente a 5,6 g ha⁻¹ de Co e 56 g ha⁻¹ de Mo.

Após a colheita manual das plantas da área útil, foi passado o implemento triturador (TCP 160) acoplado a um trator para simular uma colheita mecânica das plantas das bordaduras para a continuidade do monitoramento de N₂O e das variáveis acessórias nitrato, amônio e umidade do solo.

3.6 Avaliação das Emissões de N₂O na Soja

No experimento em casa de vegetação as coletas de N₂O foram realizadas utilizando uma câmara estática formada pelo próprio vaso (Figura 4) em que as plantas se encontravam, configurando a base da câmara, que tinha na parte superior uma canaleta de borracha no formato de calha para ser preenchida com água e permitir o selamento com a tampa durante a incubação. Após a adição da água na canaleta a câmara era fechada utilizando outro vaso semelhante como tampa, sendo o gás coletado e analisado simultaneamente utilizando o Analisador Ultra Portátil de Gases de Efeito Estufa (Los Gatos Research – LGR, USA). O analisador foi ajustado para quantificar a concentração de N₂O a cada segundo, e em um tempo total de coleta de 3 minutos por câmara era possível estimar a taxa de acumulação do gás. Para o cálculo dos fluxos de N₂O foi considerado os 2 minutos finais (120 pontos analisados) da amostragem, sendo o primeiro minuto descartado para considerar o tempo que o gás percorre a mangueira até ser analisado.



Figura 4. Câmaras, coleta e análise de N₂O utilizando o Analisador Ultra Portátil de Gases de Efeito Estufa (CRDS). Foto: Wadson de Menezes Santos.

Os fluxos de N₂O nos experimentos em campo foram monitorados utilizando uma câmara estática (ALVES et al., 2012) por parcela experimental, inseridas na linha de plantio mantendo-as até o final do experimento com as amostragens realizadas manualmente (Figura 5 e 6). O monitoramento foi iniciado com o plantio da soja, sendo continuado após a colheita, visando verificar a contribuição dos resíduos em decomposição para as emissões de N₂O. As plantas do interior das câmaras foram cortadas rende ao solo, e suas vagens debulhadas, sendo os resíduos posteriormente devolvido as câmaras.



Figura 5. Câmara estática manual quando a coleta de gás foi realizada com seringas. Foto; Wadson de Menezes Santos.

Além das câmaras instaladas nos tratamentos, cinco câmaras sem a presença de plantas de soja ou resíduos foram instaladas ao redor do experimento para quantificar os fluxos de N_2O provenientes do solo para servir de referência para estimar as emissões dos resíduos.

A câmara foi composta por uma base e uma tampa que eram acopladas no momento da amostragem dos fluxos de N_2O emitidos do solo. A base da câmara consistia em uma estrutura de metal retangular (40 × 60 cm) com altura de 7,5 cm, com uma canaleta (3 cm de largura e 2,5 cm de altura) na parte superior, sendo a base inserida no solo até a altura da canaleta. No experimento de 2020, a base foi alterada, utilizando-se uma com paredes de 25 cm de altura, que foi inserida 7,5 cm no solo.

A tampa da câmara do experimento 2017/2018 consistia em uma caixa de polietileno com as mesmas dimensões da base, e altura de 45 cm, revestida com espuma e manta refletiva. Na parte superior da tampa foi posicionada uma válvula com uma conexão de quatro vias fixadas na parte de dentro da tampa para permitir acessar o conteúdo da atmosfera da câmara no ato da amostragem. No experimento de 2020 foi utilizada uma tampa de polietileno com 23 cm de altura, e para avaliar as emissões de N_2O do solo com as plantas maiores, um extensor com 25 cm de altura foi colocado entre a base e a tampa. O extensor metálico apresentava as mesmas dimensões da base, e também era composto por uma canaleta na parte superior. Após a colheita, para avaliar as emissões dos resíduos, o extensor foi retirado, e no experimento 2017/2018 a tampa foi substituída por outra de bandeja de polietileno retangular (40 × 60 cm) com 10 cm de altura, seguindo o mesmo modelo de dispositivo utilizado nas tampas anteriores.

Foram instalados em cada câmara uma ventoinha de computador (10 x 10 cm) ligada a uma bateria de 12V para permitir a homogeneização do ar no interior da câmara durante a incubação.

Antes da amostragem, as ventoinhas eram acionadas e as canaletas das bases preenchidas com água e a tampa pressionada sobre a canaleta, permitindo a vedação entre a base e a tampa durante o período de incubação. As amostragens foram realizadas entre as 8:00 e 10:00 horas da manhã, horário que melhor representa a média do fluxo diário de N_2O (ALVES et al., 2012). Após o fechamento da câmara, uma seringa de 60 mL era acoplada à válvula de três vias do tipo “luer lock” existente na tampa para retirar um volume de 50 mL de gás. As primeiras amostragens foram realizadas imediatamente após o fechamento das câmaras e as demais amostragens após 20, 40 e 60 min de incubação. No início e fim da incubação dos gases foram tomados os dados de temperatura no interior da câmara com termômetro digital.

Posteriormente, as seringas foram acopladas a uma bomba de vácuo para transferir 20 mL do gás para frascos de cromatografia. As análises das concentrações de N_2O foram realizadas usando um cromatógrafo a gás (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) equipado com detector de captura de elétrons (JANTALIA et al., 2012).

No experimento 2020, utilizou-se um analisador portátil de N_2O que utiliza a espectrometria laser de cavidade ressonante (CRDS) (Analisador Ultra Portátil de Gases de Efeito Estufa, Los Gatos Research – LGR, Califórnia, USA). No momento da coleta, a tampa era acoplada à base, e o analisador era conectado ao espaço interno da câmara por meio de uma mangueira conectada na válvula de três vias existente na tampa (Figura 6).



Figura 6. Câmara estática manual, coleta com o Analisador Ultra Portátil de Gases de Efeito Estufa (CRDS). Foto: Wadson de Menezes Santos.

Os fluxos de N_2O ($\mu g \text{ N-}N_2O \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$) foram calculados a partir do aumento linear da concentração de N_2O ao longo do tempo de amostragem (DE KLEIN et al., 2014), utilizando a equação $FN_2O = dC/dt (M/Vm) (V/A)$, onde dC/dt é a mudança de concentração de N_2O ($\mu L \text{ L}^{-1}$) na câmara após o tempo de incubação (horas); V e A são respectivamente o volume da câmara (L) e a área de solo coberta pela câmara (m^2); M é o peso molecular do N_2O e Vm é o volume molecular na temperatura de amostragem (VAN DER WEERDEN et al., 2016).

O fator de emissão (FE) foi calculado para os experimentos de campo pela diferença entre a emissão de N_2O acumulada do tratamento com planta e o Controle, sem planta, dividido pelo N acumulado nos resíduos (IPCC, 2006). E a intensidade de emissão é a quantidade acumulada de N_2O emitida dividida pela produtividade de grãos.

Para o cálculo da emissão acumulada e a intensidade de emissão de N_2O os dados foram divididos em duas épocas, a primeira considerando todo o período experimental (Total) e a segunda o período de decomposição dos resíduos (Resíduos) a partir de 80 e 79 DAP (dias após o plantio) nos experimentos de campo 2017/2018 e 2020, respectivamente, quando foi realizada a primeira coleta das folhas senescentes. Como no experimento em casa de vegetação não foi quantificada a senescência das folhas, considerou-se as emissões dos resíduos a partir dos 86 DAP, quando também percebeu-se o início do aumento nos fluxos de N_2O .

As amostragens no experimento de campo 2017/2018 foram realizadas em média a cada três dias durante o ciclo da cultura (42 coletas), e a cada nove dias após a colheita, com aumento da frequência após eventos de precipitação (13 coletas) correspondendo a um período experimental de 247 dias. No experimento de campo em 2020 foram realizadas 17 coletas no período de crescimento da cultura, em média a cada 6 dias, e após a colheita foram 20 coletas com maior frequência no início da pós-colheita e eventos de precipitação com período total de avaliação de 220 dias.

No experimento em casa de vegetação foram realizadas 22 coletas durante o ciclo da cultura e mais 22 após a colheita. Na maioria das coletas, os vasos haviam sido irrigados no dia anterior a coleta para favorecer as emissões de N_2O pelo processo de desnitrificação, compondo um período de avaliações de 181 dias.

3.7 Monitoramento dos Teores de Nitrato, Amônio e Umidade do Solo

Para o monitoramento dos teores de nitrato, amônio e umidade do solo no experimento em casa de vegetação foram realizadas amostragens de solo na profundidade de 0-10 cm, as

quais foram executadas em vaso extra, sempre que mudanças na magnitude dos fluxos de N₂O eram observadas.

Nos experimentos em campo as amostragens também foram na profundidade de 0-10 cm por parcela com frequência semanal durante o ciclo da cultura, e a cada coleta de gás após a colheita.

Os teores de nitrato foram determinados por espectrometria de UV, o amônio pela reação colorimétrica de Berthelot, e a umidade gravimétrica determinada em 20 g de solo, sendo seca em estufa a 105 °C até se obter massa constante.

No final dos experimentos foram determinadas a densidade do solo a partir de amostras indeformadas por parcela no caso dos experimentos em campo, ou de amostras retiradas dos vasos, no caso do experimento em casa de vegetação. As amostras foram secas em estufa por 48 horas à 105 °C. Com esses dados foram calculados o espaço poroso saturado por água (EPSA), dividindo-se o conteúdo volumétrico de água pela porosidade total. O teor volumétrico de água é definido pela umidade gravimétrica multiplicado pela densidade do solo. A porosidade total (%) é igual a $[1 - (\text{densidade do solo} / \text{densidade de partículas})] \times 100$. A densidade de partículas considerada foi 2,65 kg dm⁻³ (KIEHL, 1979).

3.8 Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio

A avaliação da nodulação ocorreu aos 43 DAP em ambos os experimentos em campo sendo coletadas cinco plantas na parte central da segunda linha de plantio de cada parcela. Em seguida, foram separadas a parte aérea da raiz no nível da superfície do solo, depois as raízes foram lavadas e os nódulos destacados. Após este procedimento, os nódulos, raízes e parte aérea coletadas foram acondicionadas em sacos de papel, os quais foram levados para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante, e em seguida foram determinadas suas respectivas massas secas. Nestas coletas, foram determinados o teor de N total das respectivas partes da planta pelo método de digestão úmida de Kjeldahl.

A coleta das plantas para quantificar a fixação biológica de nitrogênio ocorreu quando estas alcançaram o estágio R5.5 “meio enchimento de grãos”, fase em que ocorre o máximo acúmulo de nitrogênio na planta, o que ocorreu aos 62 DAP no experimento em casa de vegetação. As plantas foram amostradas em três dos cinco vasos extras, sendo a parte aérea e a raiz separadas. Após a lavagem das raízes, os nódulos foram destacados e separados. Amostras da parte aérea das plantas testemunhas (*Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor* e *Zea mays*) foram coletadas, e em seguida todo o material coletado foi colocado para secar em estufa com circulação forçada de ar à 65 °C para determinação das massas secas. Amostras do solo não plantado também foram retiradas para determinação da abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N), sendo secadas e posteriormente pulverizadas em moinho de rolos para subsequente análise.

Nos experimentos em campo, plantas no estágio R5.5, ou aos 87 e 70 DAP nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, foram coletadas. A coleta correspondeu a parte aérea das plantas, em 2 m lineares na área central das parcelas, sendo 1 m em cada uma das duas linhas centrais, para determinação de massa fresca. Do total das plantas coletadas, foram subamostradas cinco plantas, cujas vagens foram destacadas, sendo também realizada a avaliação de nodulação, com determinação da massa seca e teor de N dos nódulos e raízes como já descrito anteriormente. Na ocasião da amostragem, também foram coletadas dentro da área experimental, com 5 repetições, as plantas testemunhas *Sorghum bicolor*, *Eleusine indica*, *Urochloa brizantha* e *Commelina diffusa* no experimento 2017/2018, e para o experimento de 2020, foram coletadas as plantas *Sorghum bicolor*, *Eleusine indica*, *Oryza sativa*, *Digitaria sanguinalis* e *Ipomoea acuminata*. Assumiu-se que são plantas não fixadoras de N₂, utilizadas para determinar a marcação de δ¹⁵N do solo.

As subamostras de parte aérea e vagem dos experimentos em campo, e as suas respectivas plantas testemunhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante, e foram determinados a massa seca das subamostras tornando possível estimar a massa seca da amostra em 2 m lineares, e também uma estimativa por hectare.

Em seguida todo o material vegetal coletado no campo e casa de vegetação foi moído em moinho de facas tipo Wiley (<0,85 mm), e também em moinho de rolos, até a amostra ser transformada em pó fino, conforme descrito por Arnold e Schepers (2004). A abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) foi determinada com o auxílio do espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (Finnigan Delta V) acoplado a um analisador elementar (Carlo Erba EA 1108). Amostras de sementes do lote utilizado no plantio foram pesadas, trituradas e moídas finamente para análise de N-total e $\delta^{15}\text{N}$, para deduzir a participação do N da semente na abundância de $\delta^{15}\text{N}$ da planta, conforme descrito por Okito et al. (2004).

O cálculo da contribuição do N derivado da FBN (%Ndfa) foi baseado na Equação de Shearer e Kohl (1986) (Equação 4):

$$\%Ndfa = 100 \times (\delta^{15}\text{N planta de referência} - \delta^{15}\text{N leguminosa}) / (\delta^{15}\text{N planta de referência} - B) \quad (4)$$

Onde B é uma constante relacionada ao processo de discriminação isotópica de ^{15}N quando se utiliza somente a parte aérea da planta para quantificar a FBN, aqui considerada como sendo -1,3 $\delta^{15}\text{N}$ (UNKOVICH et al., 2008).

3.9 Senescência das Folhas dos Experimentos em Campo

Na entrelinha de cada parcela uma faixa de solo de 1 m² foi coberta com tecido tule para que os resíduos aéreos da soja fossem depositados e recolhidos. As coletas dos materiais senescentes ocorreram aos 80, 97, 105 e 188 DAP no experimento 2017/2018, e aos 79, 86 e 94 DAP no experimento 2020.

A massa seca total dos resíduos depositados ao longo do ciclo da cultura foi quantificada após secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, assim como o conteúdo de N existente após moagem em moinho de facas de aço inoxidável tipo Wiley (<0,85 mm), e determinação do teor de N total pelo método de digestão Kjeldahl.

3.10 Produtividade de Grãos

O experimento em casa de vegetação foi colhido em 24 de dezembro de 2019, em três vasos por tratamento, e foram determinados os seguintes parâmetros: número de vagens e grãos por planta, número de grãos por vagem e massa de grãos por planta, padronizados a 13% de umidade determinado pelo método da estufa (MAPA, 2009).

Os experimentos de campo realizados em 2017/2018 e em 2020 foram colhidos manualmente em 12 de março de 2018 (133 DAP) e 29 de abril de 2020 (99 DAP), respectivamente. Para estimar a produtividade de grãos foi utilizada uma área útil de 3 m² por parcela (1,5 m das 4 linhas centrais, descartando-se 1 m em cada bordadura). Os grãos colhidos foram pesados, sendo em seguida a massa corrigida para a umidade padrão comercial de 13% determinado pelo método da estufa (MAPA, 2009), e os resultados foram calculados para apresentação em kg de grãos ha⁻¹. Foram determinadas as massas secas dos resíduos da colheita após secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, e também foram analisados o teor de N nos grãos e resíduos pelo método de digestão Kjeldahl.

3.11 Balanço de Nitrogênio na Soja dos Experimentos em Campo

Os dados do teor de N juntamente com de massa seca de todas as partes da planta quantificadas separadas, foram utilizados para estimar a quantidade de N acumulada pela cultura da soja, considerando a massa seca multiplicada pelo teor de N de suas respectivas partes, que após somados resultaram no acúmulo total de N na soja estimados em kg ha⁻¹.

A partir dos resultados de %Ndfa foi possível quantificar a contribuição da FBN em kg ha⁻¹ de N para cada tratamento de estirpe, multiplicando o %Ndfa pelo N acumulado na planta de soja. O N exportado pela soja foi considerado como sendo o N acumulado nos grãos, e o N residual foi estimado pela diferença entre o N acumulado na planta e o N exportado nos grãos. O N derivado do solo foi estimado como a diferença entre o total de N acumulado na planta e o total de N derivado da FBN. E por fim, o balanço de N do solo foi calculado pela diferença entre o N residual e o N derivado do solo na planta.

3.12 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real (qPCR)

3.12.1 Coleta e preparo das amostras de nódulos e solo para extração de DNA

Nos experimentos em campo 2020 e em casa de vegetação foram coletados os nódulos de duas plantas de soja por parcela, que foram destacados, lavados em água, e em seguida armazenados em potes (50 mL) contendo sílica gel. Nesta ocasião também foi coletado o solo rizosférico e armazenados em *freezer*.

Após secagem em sílica, os nódulos foram desinfestados em hipoclorito de sódio (0,5%) por 10 min, e em seguida enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada. Após a secagem em capela de exaustão com fluxo de ar ligado, os nódulos foram macerados com o auxílio de nitrogênio líquido em gral e pistilo, e 100 mg da amostra foram pesados em microtubos de 2 mL para a extração do DNA total.

3.12.2 Extração de DNA dos nódulos e solo

Para a extração de DNA dos nódulos com CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) foram utilizados 900 µL do tampão [2% de brometo de hexadeciltetrametilamônio (CTAB); 1,42 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH = 8,0; 20 mM EDTA pH = 8,0; 2% polivinilpirrolidona (PVP); 5 mM ácido ascórbico e 4 mM ácido dietitiotiocarbâmico (DIECA)] pré-aquecido a 65 °C. As amostras foram colocadas em banho-maria por 20 min e foram homogeneizadas suavemente por quatro vezes nesse período. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e adicionou-se 3 µL de RNase (20 mg mL⁻¹) e 5 µL de Proteinase K (1 mg mL⁻¹) com posterior incubação a 37 °C por 30 min.

Após esse período, adicionou-se 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão suave até formar uma emulsão e submetida a centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, em seguida foi adicionado isopropanol em volume correspondente a 70% do volume do sobrenadante da fase aquosa, as amostras foram invertidas suavemente e colocadas no gelo por 15 min, depois centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* de DNA formado foi adicionado 500 µL de álcool 70% com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi colocado para secar por 2 h em capela de exaustão com fluxo de ar ligado, após a secagem o DNA foi reidratado com 50 µL de TE pH = 8,0.

Para a extração do DNA das amostras de solo rizosférico foi realizada em subamostras de 250 mg utilizando o DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) de acordo as especificações do fabricante.

O rendimento das amostras de DNA em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ foi mensurada por absorbância (A) no comprimento de onda de 260 nm, e a qualidade do DNA extraído foi dada pela relação (A_{260}/A_{280} nm), sendo os valores entre 1,8 e 2,0 considerados adequados (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; AZEVEDO et al., 2003), avaliados em espectrofotômetro utilizando o equipamento NanoDrop® Spectrophotometer 2000c, em seguida as amostras de DNA foram padronizadas a concentração de 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para os nódulos, e 4 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para o solo.

As amostras que não se enquadraram no parâmetro de qualidade do DNA foram realizadas a purificação das amostras, adicionando 500 μL do tampão de precipitação AW1 e filtrado em coluna (Spin Columns 2 mL - DNeasy® Plant Mini Kit/Qiagen) após centrifugação por 2 min a 8.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado, e em nova coluna foi adicionado 500 μL do tampão de precipitação AW2 e realizado nova centrifugação (2 min/8.000 rpm), e destacado o sobrenadante. Após a secagem em capela de exaustão por 2 h o *pellet* de DNA foi reidratado com 50 μL de TE pH = 8,0.

A integridade do DNA genômico extraído foi observada em gel de agarose 1% (m:v) em tampão TAE 1x, submetido a eletroforese (70 V/90 min), corado com brometo de etídeo, foto-documentado e registrado pelo programa KODAK® Gel Logic 100 Image System.

3.12.3 Condições da reação da PCR dos nódulos

As condições das reações realizadas em termociclador para todos os pares de iniciadores (primers) para amplificação dos genes 16S rDNA, *norC* e *nosZ* são descritos da Tabela 4. As sequências dos genes *norC* e *nosZ*¹ relacionados ao processo de desnitrificação presentes no genoma de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp. foram alinhadas e as regiões similares para as diferentes espécies foram selecionadas para desenhar os iniciadores específicos para cada gene. O primer *nosZ*² foi selecionado na literatura, e apresenta a característica de não especificidade.

Tabela 4. Sequência dos primers e condições das reações de PCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação *norC* e *nosZ*.

Genes	Primers	Sistema de reação (15 µL)	Condições de reação	Referência
16S rDNA	27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' Amp2: 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'	3,0 µL do tampão (5x); 1,50 µL de MgCl ₂ (25 mM); 0,3 µL de dNTP (10 mM); 0,9 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,1 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 6,30 µL de H ₂ O livre de nucleases; 2 µL da amostra de DNA bacteriano (10 ng µL ⁻¹)	95°C por 5 min; 35 ciclos: 95°C por 45 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 s; 72°C por 5 min	FURUSHITA et al. (2003) WANG et al. (1993)
<i>norC</i>	BradyAzoNorC154-173f: 5'-CGSGGCAAGCAYGTSTGGGA-3' BradyAzoNorC337-356r: 5'-TGAAYTGMGGCATCTGNCGSC-3'	3,0 µL do tampão (5x); 1,25 µL de MgCl ₂ (25 mM); 0,3 µL de dNTP (10 mM); 0,5 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,1 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 7,35 µL de H ₂ O livre de nucleases; 2 µL da amostra de DNA bacteriano (10 ng µL ⁻¹)	95°C por 5 min; 35 ciclos: 95°C por 30 s, 66°C por 30 s, 72°C por 30 s; 72°C por 5 min	Este trabalho
<i>nosZ</i> ¹	BradyAzoNosZ-333-354f: 5'-CTGGGGCCWGACSAACGAARGC-3' BradyAzoNosZ-114-1134r: 5'-GTCSCGYGGYTTGATCTTGTC-3'	3,0 µL do tampão (5x); 1,50 µL de MgCl ₂ (25 mM); 0,3 µL de dNTP (10 mM); 0,9 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,1 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 6,30 µL de H ₂ O livre de nucleases; 2 µL da amostra de DNA bacteriano (10 ng µL ⁻¹)	95°C por 5 min; 35 ciclos: 95°C por 45 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30 s; 72°C por 5 min	Este trabalho
<i>nosZ</i> ²	<i>nosZ</i> -F:5'-CGYTGTTCMTC GACAGCCAG-3' <i>nosZ</i> -1622R:5'-CGSACCTT STTGCCSTYGCG-3'	3,0 µL do tampão (5x); 1,2 µL de MgCl ₂ (25 mM); 0,3 µL de dNTP (10 mM); 1,8 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,105 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 5,195 µL de H ₂ O livre de nucleases; 1 µL da amostra de DNA bacteriano (10 ng µL ⁻¹); 0,6 µL de Tween 20 2% (v:v)	98°C por 2 min; 35 ciclos: 98°C por 10 s, 60°C por 30 s, 72°C por 20 s; 72°C for 5 min	MAO et al. (2011)

*nosZ*¹: primer específico para *Bradyrhizobium* spp.; *nosZ*²: primer geral.

Utilizou-se 15 µL do produto da PCR para eletroforese (90 V/90 min) em gel de agarose 2%, em seguida corado com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador. As amostras amplificadas seguiram para o sequenciamento do DNA.

3.12.4 Condições da reação da qPCR dos nódulos e solo

As condições de reação e sequência de primers utilizados para os genes 16S, *nirK* e *nosZ* são apresentados na Tabela 5. Foi realizada uma quantificação do número de cópias com base na curva padrão de cada gene, obtidas por diluições plasmidiais que variaram de 10^2 a 10^7 , cuja eficiência de amplificação para o 16S foi 95,8% ($R^2 = 0,99$), para o *nirK* foi 99,96% ($R^2 = 0,99$) e *nosZ* 100,8% ($R^2 = 0,98$), para o controle negativo foi utilizado água livre de nucleases. As amostras foram aplicadas em duplicata em placas MicroAmp™ Fast Optical 0,1 mL (Thermo Fisher Scientific, EUA) de 96 poços, e analisadas no equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystem, EUA), na modalidade fast, com configuração para excitação de Sybr Green.

O número de cópias obtido a partir da qPCR foi normalizado para obtenção do valor correspondente a 1 g das amostras de nódulos e solo.

Tabela 5. Sequência dos primers e condições das reações de qPCR para o gene 16S rDNA, e os genes de desnitrificação nirK e nosZ.

Genes	Primers	Tamanho do fragmento (pb)	Sistema de reação (10 µL)	Condições de reação	Referência
16S rRNA	1055yF: 5'- ATGGYTGTCGTCAGCT-3' 1392R: 5'- ACGGGCGGTGTGTAC-3'	500	3,0 µL do tampão (5x); 1,50 µL de MgCl ₂ (25 mM); 0,3 µL de dNTP (10 mM); 0,9 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,1 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 6,30 µL de H ₂ O livre de nucleases; 2 µL da amostra de DNA bacteriano (10 ng µL ⁻¹)	95°C por 2 min; 35 ciclos: 95°C por 30 s, 59°C por 1 min	RITALAHTI et al. (2006); LANE (1991)
nirK	F1aCu: 5'-ATCATGGTS CTGCCGCG-3' R3Cu: 5'-GCCTCGATCA GRTTGTGGTT - 3'	473	4,5 µL SYBR® Green (Qiagen); 0,4 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,3 µL de Tween-20 2% (v:v); 0,9 µL de H ₂ O livre de nucleases; 3,5 µL da amostra de DNA bacteriano (nódulo 10 ng µL ⁻¹ e solo 4 ng µL ⁻¹)	95°C por 20 s; 45 ciclos: 95°C por 3 s, 62°C por 20 s, 72°C por 45 s; 95°C por 1 s, 60°C por 20 s, 95 °C por 1 s	HALLIN; LINDGREN (1999); THROBÄCK et al. (2004)
nosZ	nosZ-2F:5'-CGCRACGGCA ASAAGGTSMSSGT-3' nosZ-2R:5'- CAKRTGCAKS GCRTGGCAGAA-3'	267	4,5 µL SYBR® Green (Qiagen); 0,8 µL de cada primer (F+R, 10 mM); 0,2 µL de Tween-20 2% (v:v); 0,2 µL de H ₂ O livre de nucleases; 3,5 µL da amostra de DNA bacteriano (nódulo 10 ng µL ⁻¹ e solo 4 ng µL ⁻¹)	Touchdown PCR: 95°C por 5 min; 6 ciclos: 95°C por 30 s, 65-60°C (-1°C a cada ciclo) por 30 s, 72°C por 30; 34 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s, 72°C por 30 s	HENRY et al. (2006)

3.13 Análises Estatísticas

Antes da análise de variância (ANOVA) dos dados, as pressuposições de normalidade e homogeneidade dos erros foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Quando necessário, os dados foram transformados ($\sqrt{x}$ ou $\sqrt{x+1}$). Após ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste LSD de Fisher com probabilidade de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises preliminares do DNA dos nódulos (dados não mostrados) indicaram que as estirpes inoculadas possivelmente não colonizaram os nódulos nos dois experimentos de campo. No experimento 2017/2018 foi utilizando a técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) pela análise conjunta dos genes *housekeeping*, e no experimento 2020 essa inferência foi obtida pela ausência nos nódulos dos genes de desnitrificação (*nirK* e *nosZ*). Diferentemente, no experimento em casa de vegetação em que os nódulos formados foram compatíveis com a presença e/ou ausência dos genes de desnitrificação (*nirK*, *norC* e *nosZ*) com as estirpes inoculadas, provavelmente ocorreu devido à alta quantidade de células de *Bradyrhizobium* spp. inoculada por massa de solo (8 kg vaso⁻¹). Aparentemente, em condição de campo, estirpes nativas de *Bradyrhizobium* spp. foram mais competitivas que as estirpes inoculadas recomendadas para a soja no Brasil.

O sucesso da inoculação de rizóbios pode ser limitado por vários fatores, incluindo as condições ambientais, o número de células aplicadas, a presença de rizóbios indígenas (nativos) como potencial competidores por sítios de nodulação, e o método de inoculação (BOGINO et al., 2008). Em estudo realizado com a soja em Moçambique, por exemplo, foi observada grande variabilidade na eficácia simbiótica, em que dez isolados indígenas apresentaram melhor desempenho simbiótico que a estirpe comercial USDA 110 (*B. diazoefficiens*) (CHIBEBA et al., 2017). Em geral, espera-se que as estirpes usadas em inoculantes comerciais sejam competitivas com rizóbios indígenas, porém embora apresentem baixa eficiência simbiótica, as estirpes indígenas são altamente adaptadas às condições ambientais locais (AL-FALIH, 2002; GRÖNEMEYER et al., 2014).

4.1 Emissões de N₂O no Experimento em *In Vitro*

Os resultados observados nas condições *in vitro* demonstraram que as estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e 29 W) não produziram N₂O em vida livre (Figura 7) pelo fato de não possuírem genes de desnitrificação (Tabela 1 e 8) (ZILLI et al., 2019). O estudo realizado por Nascimento (2011) também em condições de incubação *in vitro* descobriu que a SEMIA 587 e a 29 W apresentaram baixas emissões de N₂O comparadas a CPAC 7 e a CPAC 15, e que a adição de acetileno a estas estirpes aumentaram as emissões de N₂O. A capacidade das bactérias de reduzir as emissões de N₂O após a adição de NO₃⁻ *in vitro* sugere que elas podem mitigar as emissões de N₂O em solo fertilizado com NO₃⁻ (USYSKIN-TONNE et al., 2019).

Contudo, no estudo de Obando et al. (2019) observou-se que a SEMIA 587 e a SEMIA 5019 apresentaram capacidade de produzir N₂O. O presente estudo realizado em casa de vegetação também foi observado elevadas emissões de N₂O destas estirpes (Tabela 8).

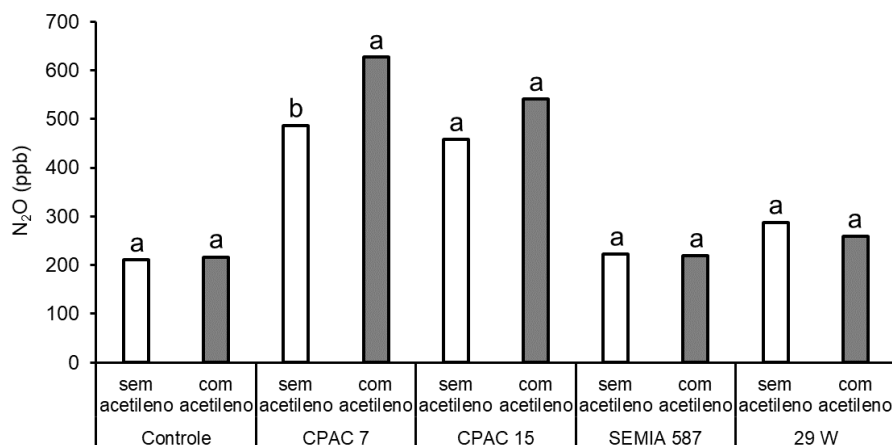


Figura 7. Emissão de N₂O de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em condições controladas in vitro. As médias foram comparadas entre os tratamentos com e sem acetileno para cada estirpe pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade. CV= 26,1%.

As estirpes CPAC 7 e CPAC 15 produziram N₂O, sendo que a adição do acetileno a CPAC 7 inativou parcialmente a enzima óxido nitroso redutase (*nosZ*), aumentando a produção de N₂O. A CPAC 7 sem acetileno ainda resultou em alta produção de N₂O, apontando um escape desse gás mesmo com o conjunto completo de genes de desnitrificação, possivelmente devido ao tempo de incubação que não foi suficiente para a redução completa do N₂O a N₂.

Por outro lado, confirma-se que a estirpe comercial CPAC 15 tem potencial para emissão de N₂O, mas que a presença de CPAC 7 pode diminuir esse impacto por reduzir N₂O a N₂.

4.2 Nodulação e Componentes da Produtividade no Experimento em Casa de Vegetação

Os resultados da nodulação e dos componentes de produtividade são apresentados na Tabela 6. As plantas inoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. aumentaram a massa seca de nódulos. Os resultados de Guimarães et al. (2008), Okito et al. (2004) e Araujo et al. (2018) indicaram que a inoculação da soja com as estirpes 29 W e SEMIA 587 aumentaram a nodulação em relação a CPAC 7 e CPAC 15, porém no presente estudo não houve diferença entre estirpes.

A inoculação da soja com a estirpe CPAC 7 proporcionou maior número de vagens por planta em relação ao Controle e a inoculação com a estirpe 29 W, e maior número de grãos por planta comparadas ao Controle e a SEMIA 587, não diferindo dos demais tratamentos. Para a massa seca de parte aérea e massa de grãos por planta não houve efeitos ($p < 0,05$) dos tratamentos. Esses resultados mostram que a inoculação resulta em benefícios para produção, embora tenha havido certa vantagem pelo uso de *B. diazoefficiens* e *B. japonicum* em lugar de *B. elkanii*.

Tabela 6. Massa seca de nódulos e parte aérea no estádio R5.5 (meio enchimento de grãos), massa grãos por planta e componentes da produtividade, como número de vagens e grãos por planta, e número de grãos por vagem avaliados após a colheita da soja (cv. BRS 284) inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. no experimento em casa de vegetação.

Tratamentos	MS de nódulos	MS de parte aérea	M. de grãos	Nº de vagens/planta	Nº de grãos/vagem	Nº de grãos/planta
	- mg planta ⁻¹ -	- g planta ⁻¹ -	- g planta ⁻¹ -			
CONTROLE	239 b	11,9 a	4,9 a	20 c	2,5 a	48 c
CPAC 7	506 a	11,0 a	5,3 a	24 a	2,4 a	57 a
CPAC 15	485 a	11,8 a	5,4 a	23 ab	2,4 a	54 ab
SEMIA 587	561 a	11,0 a	5,1 a	22 abc	2,4 a	52 bc
29 W	635 a	11,0 a	5,4 a	21 bc	2,5 a	52 abc
Média	485	11,3	5,2	22	2,4	53
CV (%)	21,8	4,2	8,1	9,4	6,3	7,7

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

No estudo de Guimarães et al. (2008) a inoculação da soja com a CPAC 15 aumentou o acúmulo de massa seca de parte aérea da soja em relação as demais estirpes utilizadas neste trabalho.

4.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Experimento em Casa de Vegetação

A inoculação da soja aumentou em média 58 e 487% o N acumulado na planta e a fixação biológica de nitrogênio, respectivamente. A abundância natural de ¹⁵N do solo estava em níveis satisfatórios, acima de 5 δ¹⁵N (Tabela 7), permitindo boa estimativa da FBN, tal como nos ensaios do campo.

No estudo de Guimarães et al. (2008), que avaliou as mesmas quatro estirpes deste estudo em casa de vegetação, foi encontrado em plantas de soja inoculadas com a estirpe CPAC 7 um maior acúmulo de N na parte aérea, e também valores mais negativos da abundância de ¹⁵N em plantas inoculadas com as estirpes de *B. elkanii* (29 W e SEMIA 587) em relação a inoculação com as estirpes CPAC 7 e CPAC 15. No trabalho conduzido em casa de vegetação de Araujo et al. (2018), na média das coletas de parte aérea da soja, a inoculação com a estirpe 29W (-2,50‰) apresentou valores mais negativos de δ¹⁵N do que com a inoculação com as estirpes CPAC 7 (-1,72‰) e a USDA 46 (-2,04‰).

A estirpe CPAC 15 (*B. japonicum*) é destacada por sua capacidade saprofítica e alta competitividade, pois possui mais genes associados a metabólitos secundários, transporte de nutrientes, aquisição de ferro e metabolismo do ácido indol-3-acético (AIA), potencialmente correlacionados com essas características que garantem maior eficiência de nodulação do que a estirpe CPAC 7 de *B. diazoefficiens*. Esta última, possui mais genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e captação de hidrogênio, potencialmente correlacionados com maior eficiência na fixação de nitrogênio (SIQUEIRA et al., 2014). Estas duas estirpes são as mais utilizadas pelos agricultores da região do Cerrado, principal região produtora de soja do Brasil (HUNGRIA; MENDES, 2015).

Tabela 7. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea por planta de soja (cv. BRS 284) inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas e solo utilizados como referência no experimento em casa de vegetação.

Tratamentos	N acumulado		$\delta^{15}\text{N}$	Ndfa
	---- mg planta ⁻¹ ----		--- ‰ ---	--- % ---
CONTROLE	159 b		7,95 a	12 c
CPAC 7	257 a		2,85 c	61 a
CPAC 15	256 a		3,81 b	52 b
SEMIA 587	246 a		3,03 c	59 a
29 W	244 a		2,76 c	62 a
Média	232		4,08	49
CV (%)	11,2		9,4	7,4
<i>Phaseolus vulgaris</i> (não nodulante)	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Zea mays</i>	Solo	Média (‰)
				9,348
----- ‰ -----				CV (%)
7,67 c	9,46 b	9,72 ab	10,54 a	5,2

Referência $\delta^{15}\text{N}$; Semente $\delta^{15}\text{N}$ = 1,473‰; Médias seguidas das mesmas letras na coluna ou linha não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

As diferenças observadas entre as plantas-referência são significativas, porém de pouco relevância tendo em conta as altas taxas de FBN estimadas para a soja. As gramíneas apresentaram maior $\delta^{15}\text{N}$ em relação a leguminosa (*Phaseolus vulgaris*), que apesar de não fixar N_2 por não ser nodulante, apresenta sementes maiores que podem ter influenciado a marcação final da planta crescida em solo limitado em N mineral. Resultados semelhantes foram observados por Guimarães et al. (2008) em estudo conduzido em casa de vegetação utilizando como plantas referência a soja não nodulante, sorgo e arroz, onde observou valores de $\delta^{15}\text{N}$ que variaram entre 6,1 e 8,8‰ na parte aérea. Além do efeito das sementes, os autores alertam para pequenas variações da abundância de ^{15}N temporais ou espaciais que podem explicar essas diferenças entre diferentes espécies usadas como controle da técnica de abundância natural de ^{15}N para cálculo da FBN.

Neste ensaio em casa de vegetação, a contribuição da FBN ficou abaixo do esperado, provavelmente pelo efeito na mineralização do N do solo com o destorroamento e peneiramento para uniformização do estudo em vasos. Valores entre 90 e 98% de Ndfa em condições de casa de vegetação já foram encontrados em outros estudos (GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010). Pauferro et al. (2010) observaram valores de Ndfa de 87 e 91% para as estirpes 29 W e CPAC 7, respectivamente. As espécies de *Bradyrhizobium* spp. apresentam diferenças no seu metabolismo, podendo assim influenciar na quantidade de N fixado pela planta (EVANS et al., 1982).

4.4 Emissões de N_2O no Experimento em Casa de Vegetação

Ao longo do período de monitoramento das emissões de N_2O (Figura 8b) houve duas fases de aumento nos fluxos de N_2O , que ocorreram entre os primeiros dias de cultivo até os 16 DAP com o maior pico de $367 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ocorrendo no segundo dia de cultivo atribuído ao tratamento Solo (sem planta). A emissão média desse período foi de $136 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$. O aumento nos fluxos foi provavelmente determinado pelo estímulo a mineralização de N do solo em função da desagregação com o preparo do solo para o experimento, observados pelo elevado teor de amônio no solo (Figura 8c), e confirma o efeito nas %Ndfa encontradas nas plantas. O preparo do solo tem impactos significativos nas propriedades do solo, disponibilidade de N

mineral, além de reduzir a abundância do gene *nosZ* (WANG et al., 2019), devido à sua baixa tolerância ao oxigênio (XU et al., 2016; SUENAGA et al., 2018).

No período inicial, o EPSA (Figura 8a) estava acima de 70% proporcionado pelas irrigações, contribuindo para o aumento da atividade microbiana, principalmente dos desnitrificadores devido a condição de anaerobiose (QIN et al., 2019).

Aos 16 DAP os fluxos de N_2O diminuíram apresentando pouca variação que se estendeu até os 78 DAP, período que compreendeu o desenvolvimento vegetativo e início da fase reprodutiva da cultura, caracterizado pela maior absorção de N do solo e acúmulo nos tecidos vegetais. Esse período também se caracterizou pela diminuição do teor de amônio (Figura 8c), e baixa concentração de nitrato no solo (Figura 8d) nos vasos que foram semeados a soja. O tratamento Solo (sem planta) apresentou acúmulo de nitrato, indicando a falta de dreno, porém com baixa desnitrificação já que este tratamento apresentou baixos fluxos de N_2O . A presença da planta representa fonte de poder redutor pela exsudação e reciclagem de tecidos senescidos, os quais favorecem processos heterotróficos como a desnitrificação. A sincronização entre a mineralização de N e a absorção de N pelas plantas parece ser o principal desafio para reduzir as emissões de N_2O (GOMES et al., 2009).

Aos 78 DAP houve aumento nas emissões de N_2O , período que coincide com o início da senescência dos nódulos, seguido da deposição de folhas e morte de raízes. Esta fase se estendeu até os 152 DAP, quando a maior parte dos resíduos de baixa relação C/N já tinham sido decompostos, persistindo os materiais vegetais de maior relação C/N como raízes e caule, e por isso observou-se redução significativa nos fluxos de N_2O . O início da senescência dos nódulos geralmente ocorre entre 5 e 11 semanas de cultivo (PUPPO et al., 2005) ou quando atingem cerca de 6 a 7 mm de diâmetro (OHYAMA et al., 2011). A decomposição dos nódulos e das folhas por apresentarem baixa relação C/N são as principais fontes de N responsáveis por emitirem N_2O (CIAMPITTI et al., 2008; SHAH, 2014).

No estudo realizado por Consentino et al. (2015), ao compararem as emissões de N_2O durante o crescimento da cultura da soja nodulante e não nodulante não observaram efeitos na quantidade de N_2O emitida. Contudo, outros estudos relataram elevadas emissões de N_2O na soja nodulante em relação a não nodulante no final do ciclo da cultura (KIM et al., 2005; CIAMPITTI et al., 2008; INABA et al., 2009). As emissões de N_2O no final do ciclo da soja podem ser explicadas pela decomposição dos nódulos da soja, já que há acúmulo de N no solo após ter sido decompostos (KAYE et al., 2007; SÁNCHEZ; MINAMISAWA, 2019). Assim, aparentemente, a degradação dos nódulos é um fator chave para a emissão de N_2O (INABA et al., 2009; 2012). Emissões de N_2O foram observadas também em condições saprofíticas e em simbiose nos nódulos de soja (OBANDO et al., 2019).

No entanto, considerando-se apenas as emissões de N_2O no final do ciclo da cultura, as plantas inoculadas com a estirpe CPAC 7 e o tratamento Solo mostraram uma tendência de menores fluxos de N_2O . Para os demais tratamentos, houve períodos de maiores fluxos de N_2O . Inicialmente, a inoculação com 29 W resultou em altos fluxos, comportamento observado também em outros momentos com a inoculação da CPAC 15, e também no Controle e com a SEMIA 587, esta última com fluxos altos de N_2O durante o maior período do monitoramento.

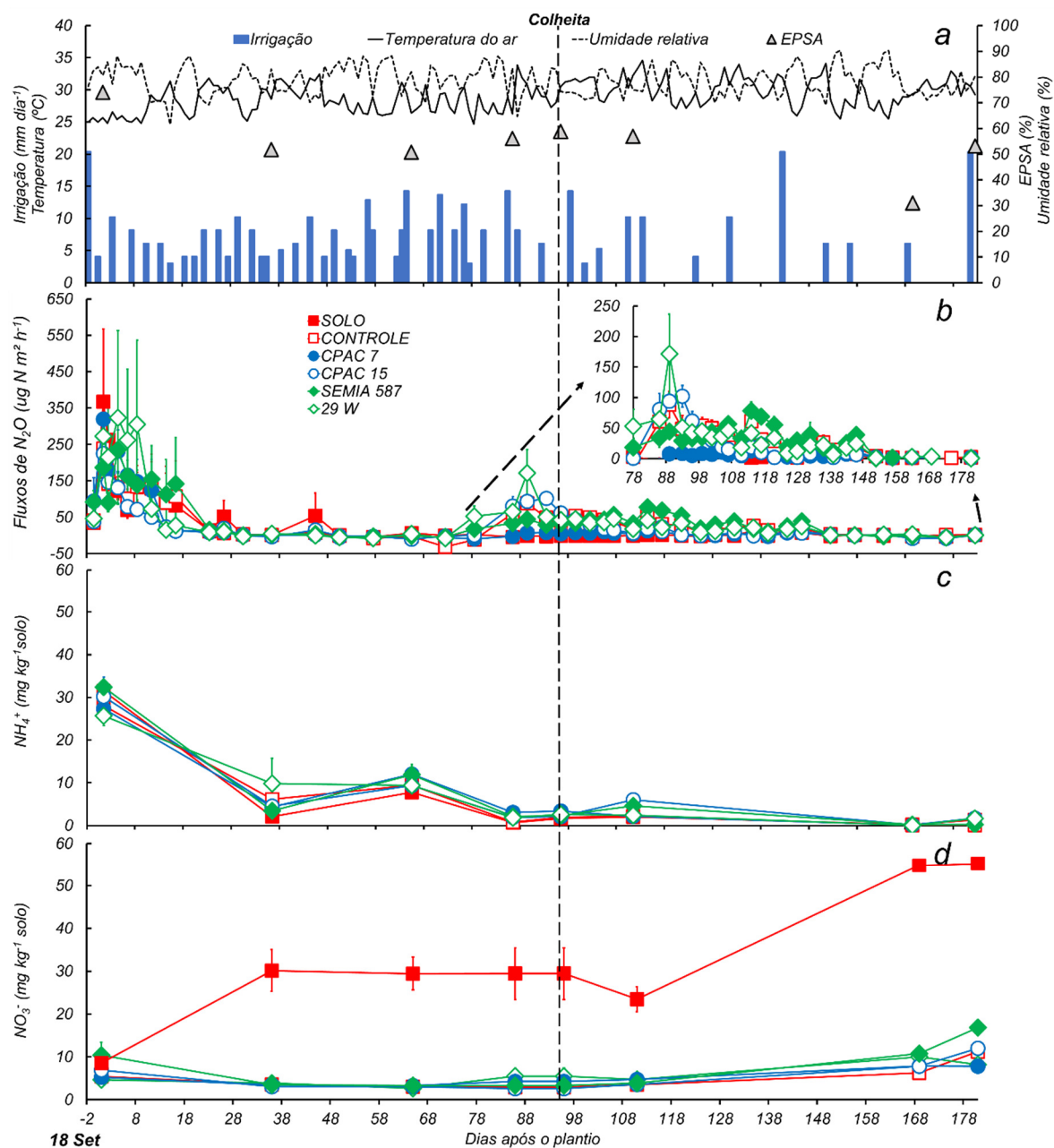


Figura 8. Irrigação, temperatura do ar, umidade relativa e espaço poroso saturado por água (EPSA) (a), fluxos de N₂O e detalhe da época de aumento dos fluxos (b), teores de amônio (c) e nitrato (d) no solo durante o período de 181 dias após o plantio da soja cultivar BRS 284 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. no experimento em casa de vegetação. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

Quanto à emissão acumulada de N₂O para a soja cultivada em vasos sob condição de casa de vegetação (Tabela 8), a estirpe CPAC 7 reduziu as emissões de N₂O em relação a 29 W, SEMIA 587 e ao Controle, não diferindo dos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram observados para a emissão acumulada dos resíduos, no qual a CPAC 7 foi ainda mais eficiente reduzindo as emissões comparadas a CPAC 15, e não diferindo das emissões de fundo quantificadas no Solo (sem planta).

Tabela 8. Emissão acumulada de N₂O (mg N-N₂O ha⁻¹), e presença nos nódulos dos genes (PCR) *norC* e *nosZ* relacionados com a desnitrificação no genoma de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. inoculados na soja (cv. BRS 284) no experimento em casa de vegetação. Sinal positivo (+) indica presença e negativo (-) indica ausência do gene.

Tratamentos	Emissão acumulada		Genes de desnitrificação	
	Total	Resíduos	<i>norC</i>	<i>nosZ</i> ¹ / <i>nosZ</i> ²
	--- g N-N ₂ O ha ⁻¹ ---			
SOLO	841 ab	20 c		
CONTROLE	1146 a	532 ab	-	-
CPAC 7	697 b	97 c	+	+
CPAC 15	805 ab	359 b	+	-
SEMIA 587	1401 a	577 a	-	-
29 W	1458 a	564 a	-	-
Média	1058	358	NO → N ₂ O	N ₂ O → N ₂
CV (%)	5,9	38,7		

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade; *nosZ*¹: primer específico para *Bradyrhizobium* spp.; *nosZ*²: primer geral.

As estirpes 29 W e SEMIA 587 não apresentam genes ligados ao processo de desnitrificação (Tabela 8 e Figura 9), e por isso as emissões de N₂O devem ser originadas de outros microrganismos desnitrificadores do solo (Figura 10) (MANIA et al., 2020). A estirpe CPAC 15 possui a capacidade de desnitrificar o NO₃⁻ até N₂O, pois não possui o gene *nosZ* responsável pela redução do N₂O a N₂. Por outro lado, a estirpe CPAC 7, que possui todos os genes de desnitrificação, pode ter sido responsável por reduzir parte do N₂O formado no solo até N₂ (ZILLI et al., 2019), como é demonstrado nos resultados da quantificação do número de cópias dos genes de desnitrificação dos nódulos na Figura 9, e do solo na Figura 10. Até mesmo a emissão de N₂O nos tratamentos com estirpes que não desnitrificam podem ser explicados pela presença dos genes de desnitrificação no solo, sendo estes responsáveis pelas emissões observadas (Tabela 8).

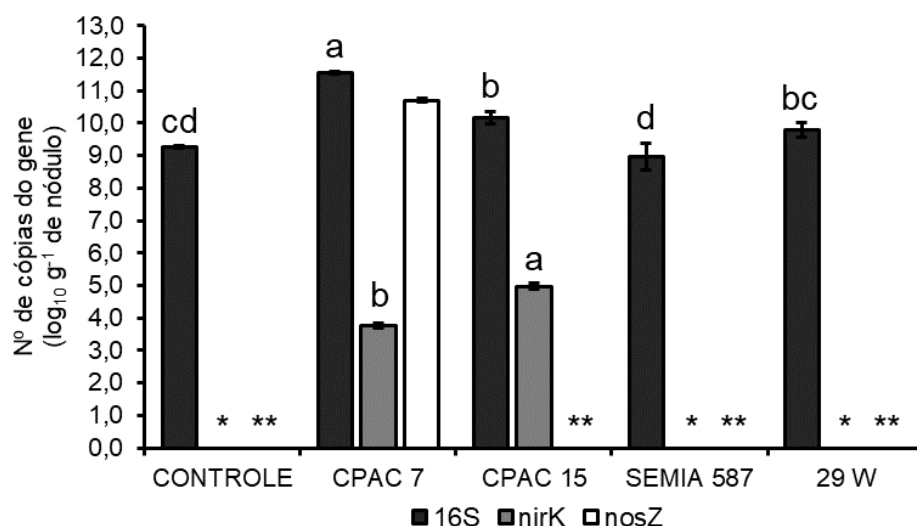


Figura 9. Número de cópias dos genes 16S, *nirK* e *nosZ* relacionadas com a desnitrificação presentes nos nódulos da soja cultivar BRS 284 no experimento em casa de vegetação inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. * representa a ausência do *nirK*, e ** representa a ausência do *nosZ*. 16S CV= 3,4%, *nirK* CV= 2,5%.

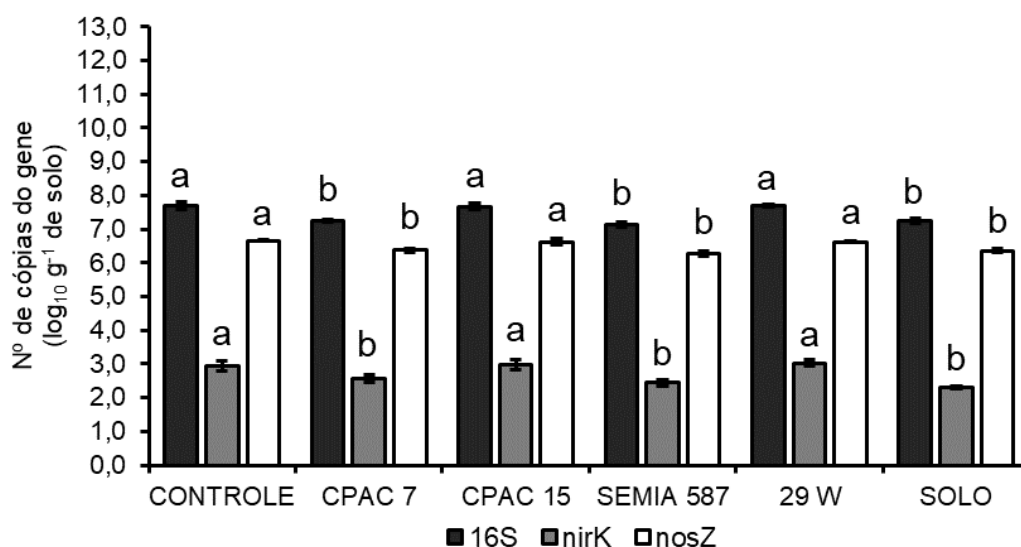


Figura 10. Número de cópias dos genes 16S, nirK e nosZ relacionadas com a desnitrificação presentes no solo cultivado com soja, cultivar BRS 284 no experimento em casa de vegetação inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 16S CV= 1,9%, nirK CV= 7,1%, e nosZ CV= 1,6%.

Apesar da desnitrificação da CPAC 15 resultar como produto final o N_2O , esta estirpe apresentou emissões intermediárias, sendo até menores que as estirpes de *B. elkanii* que não desnitrificam. A possível explicação seria que microrganismos do solo, que têm a capacidade de realizar a desnitrificação completa, possuem preferência em reduzir N_2O em detrimento ao NO_3^- , pelo fato do *nosZ* ser mais competitivo na obtenção de elétrons que a *napA*, e assim atuariam mitigando o N_2O produzido mesmo por outros microrganismos (MANIA et al., 2020; GAO et al., 2021). Além disso, concentrações mais altas de N_2O induzem ao aumento da população de bactérias que contém o gene *nosZ* (QIN et al., 2019).

Outra explicação para os resultados deste estudo está relacionada à presença da enzima hidrogenase. As estirpes 29 W, SEMIA 587 e CPAC 15 não possuem hidrogenase ativa (Hup^-) (BODDEY; HUNGRIA, 1997), e por isso produzem maiores quantidades de H_2 pela nitrogenase, que é liberada no solo, estimulando a atividade de desnitrificadores capazes de oxidar H_2 para produzir energia, podendo causar o aumento da emissão de N_2O (FLYNN et al., 2014).

A CPAC 7 além de realizar todas as etapas da desnitrificação, também possui hidrogenase ativa (Hup^+) que é capaz de reciclar o H_2 produzido pela fixação de N_2 (BODDEY; HUNGRIA, 1997; TAI; ZHANG, 2017), reduzindo o estímulo aos microrganismos desnitrificadores do solo. Estes atributos da CPAC 7 tornam esta estirpe de grande potencial para mitigar as emissões de N_2O na cultura da soja.

Em estudo recente, com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp., Obando et al. (2019) observaram que as estirpes E109, SEMIA 587, SEMIA 5019 (=29 W) e a CPAC 15 apresentaram maior produção de N_2O tanto em condição de vida livre quanto em simbiose comparadas com a USDA 110 e CPAC 7, que têm o gene *nosZ*. Apesar dos genes de desnitrificação não serem identificados *in silico* ou *in vitro* para as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, as mesmas mostraram capacidade de produzir N_2O . Os autores atribuem esses resultados a uma possível incapacidade de amplificar os genes de desnitrificação destas estirpes devido ao polimorfismo dos genes (JATON et al., 2010), como também a uma possível limitação da metodologia de PCR que pode ter afetado a amplificação desses genes nas condições experimentais deste estudo. Em outro estudo, Fernández et al. (2008) revelaram que

alguns isolados de *Bradyrhizobium* spp., apesar de não possuírem genes de desnitrificação, produziram N₂O. É possível que existam vias alternativas envolvidas na desnitrificação e emissões de N₂O de *B. elkanii*, porém nenhum estudo mostrou possibilidades relacionadas a isso.

Nas avaliações feitas neste estudo, não foi possível detectar a presença dos genes *nirK*, *norC* e *nosZ* nas estirpes de *B. elkanii* (Tabela 8 e Figura 9), e nem produção de N₂O *in vitro* (Figura 7), o que indica que outros microrganismos do solo seriam a explicação para a atividade desnitrificadora encontrada (Figura 10). No estudo de Inaba et al. (2012), observou-se que 59% das emissões de N₂O foram de outros microrganismos, enquanto o *Bradyrhizobium* spp. representou 41% das emissões totais. Populações de nematóides, protozoários, bactérias e fungos foram aumentados na rizosfera da soja com nódulos em decomposição, e alguns destes organismos são capazes de desnitrificar e emitir N₂O (INABA et al., 2009).

Diversos estudos baseados na presença do gene *nosZ* como explicação para a redução das emissões de N₂O são encontrados na literatura. Um experimento em cultura pura mostrou que bactérias fixadoras de N₂ desprovidas do gene *nosZ* produziram mais N₂O do que as bactérias com o gene *nosZ*, as quais produziram N₂ em meio contendo NO₃⁻ (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006a). Estirpes com *nosZ* têm potencial para reduzir o N₂O derivado de outras fontes diferentes dos nódulos (HIRAYAMA et al., 2011; INABA et al., 2012; MANIA et al., 2020). Em soja nodulada com a estirpe USDA110 (*B. diazoefficiens*) carregando o gene *nosZ*, verificou-se redução das concentrações de N₂O fora do nódulo, em concentração atmosférica (0,34 ppm) (SAMESHIMA-SAITO et al., 2006b).

Assim, diversos estudos têm apostado na ideia de se obter efeito de mitigação das emissões de N₂O pelo uso de bactérias fixadoras de N₂ portadoras do conjunto de genes necessários para a desnitrificação completa, especialmente pela presença do gene *nosZ* (ITAKURA et al., 2008; HÉNAULT; REVELLIN, 2011; ITAKURA et al., 2013; SHIINA et al., 2014; AKIYAMA et al., 2016).

No estudo realizado por Itakura et al. (2013) com estirpes de *B. diazoefficiens*, observou-se a redução das emissões de N₂O da estirpe com o gene *nosZ*⁺ (óxido nitroso redutase), e da estirpe *nosZ*⁺⁺ (mutante com aumento da atividade da óxido nitroso redutase) inoculadas na soja avaliadas em pós-colheita em um Andossolo dominado por 98% das bactérias sem o gene *nosZ*. Porém, ao inocular a estirpe contendo o gene *nosZ*⁺⁺ em um Fluvissole dominado por estirpes nativas com *nosZ*⁺ não foram observados redução significativas das emissões de N₂O.

Nos solos cultivados com soja, a maior proporção de bactérias desnitrificantes carece do gene *nosZ*, já que a proporção de bactérias sem *nosZ* pode ser um fator importante no controle das emissões de N₂O do solo (FERNÁNDEZ et al., 2008; PHILIPPOT et al., 2011).

A maioria do conhecimento atual sobre desnitrificação em *Bradyrhizobium* spp. baseia-se em estudos da estirpe USDA 110 (*B. diazoefficiens*) (BUENO et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2010; TORRES et al., 2017). Estudos com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a soja no Brasil e Argentina se fazem necessários por se tratar de grandes produtores mundiais, nos quais a aplicação de inoculantes são realizados em grandes escalas, podendo assim trazer impactos significativos na mitigação das emissões de N₂O na soja (OBANDO et al., 2019).

É necessário considerar a redução das emissões N₂O como uma característica importante, além da eficiência da fixação de N₂, ao utilizar e desenvolver novos inoculantes para produção de leguminosas (MANIA et al., 2020; GAO et al., 2021). A integração de soluções microbianas para melhorar o desempenho agrônômico das culturas e reduzir as mudanças climáticas tem sido alguns dos objetivos da agricultura moderna sustentável (WOLIY et al., 2019; KAVADIA et al., 2020).

4.5 Nodulação nos Experimentos em Campo

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da avaliação da nodulação realizada em duas épocas nos dois experimentos em campo. No experimento 2017/2018 as plantas dos tratamentos Controle (sem inoculação) e inoculadas com CPAC 15 apresentaram as menores médias para a massa seca de nódulos aos 43 e 87 DAP, enquanto as plantas inoculadas com a estirpe 29W apresentaram as maiores médias de nodulação nos dois experimentos e épocas de avaliação.

Tabela 9. Massa seca de nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. avaliadas em duas épocas.

Experimento 2017/2018						
Tratamentos	Nódulos		Raiz		Parte aérea	
	43 DAP	87 DAP	43 DAP	87 DAP	43 DAP	87 DAP
	----- mg planta ⁻¹ -----		----- g planta ⁻¹ -----			
CONTROLE	4 d	151 b	0,9 a	1,8 a	3,3 b	12,8 a
CPAC 7	49 c	709 a	1,1 a	2,0 a	4,2 a	13,8 a
CPAC 15	12 cd	187 b	1,0 a	1,7 a	3,9 ab	12,8 a
SEMIA 587	141 b	794 a	1,0 a	1,8 a	3,8 ab	15,0 a
29 W	242 a	955 a	1,0 a	2,0 a	4,1 a	15,6 a
Média	89	559	1,0	1,9	3,9	14,0
CV (%)	35,3	34,6	15,2	26,1	12,7	19,2
Experimento 2020						
Tratamentos	Nódulos		Raiz		Parte aérea	
	43 DAP	70 DAP	43 DAP	70 DAP	70 DAP	87 DAP
	----- mg planta ⁻¹ -----		----- g planta ⁻¹ -----			
CONTROLE	218 b	810 ab	2,2 a	1,6 ab	7,5 a	24,8 a
CPAC 7	181 b	715 b	2,3 a	1,8 a	7,6 a	23,3 a
CPAC 15	223 b	771 b	2,3 a	1,6 ab	8,0 a	25,5 a
SEMIA 587	187 b	829 ab	2,3 a	1,3 b	8,4 a	22,7 a
29 W	347 a	1132 a	2,3 a	1,5 ab	8,4 a	23,1 a
Média	231	851	2,3	1,6	8,0	23,9
CV (%)	23,2	29,6	6,2	21,9	12,4	15,9

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Em alguns estudos em casa de vegetação, observou-se que a inoculação com as estirpes de *B. elkanii* (29 W e SEMIA 587) apresentou maiores valores de massa seca de nódulos que as estirpes CPAC 7 e CPAC 15 (GUIMARÃES et al., 2008; ARAUJO et al., 2018). Resultados semelhantes também foram observados no estudo de Zilli et al. (2021) no Cerrado de Roraima em dois anos agrícolas em áreas de primeiro ano de soja, avaliados aos 60 dias após a emergência. Outro exemplo é o estudo de Pauferro et al. (2010), em que a média de quatro cultivares de soja inoculadas com a estirpe SEMIA 5019 (=29 W) para massa seca de nódulos foi superior à observada para a inoculação com a SEMIA 5080 (=CPAC 7).

A nodulação das estirpes testadas foi considerada adequada, uma vez que a massa de nódulos esteve entre 100 e 200 mg planta⁻¹ que é o suficiente para garantir o fornecimento de N requerido por uma planta de soja para seu desenvolvimento normal (HUNGRIA et al., 2007). Todos os tratamentos ficaram dentro dessa faixa aos 87 DAP no experimento 2017/2018, e nas duas épocas de avaliação no experimento 2020.

Para massa seca de raiz não houve efeito da inoculação ($p < 0,05$), porém entre as épocas as médias aumentaram dos 43 para os 87 DAP no experimento 2017/2018, porém no experimento 2020 as médias diminuíram na avaliação aos 70 DAP em relação aos 43 DAP, o que pode ser explicado por uma possível decomposição de parte das raízes pelo fato da cultivar M5917 apresentar um ciclo mais precoce que a TMG 7062.

Em relação à massa seca de parte aérea apenas o Controle apresentou menor média em relação aos tratamentos CPAC 7 e 29 W no experimento 2017/2018. Em estudo conduzido por Araujo et al. (2018) as plantas de soja inoculadas com as estirpes 29 W e SEMIA 587 apresentaram maior acúmulo de massa seca de parte aérea comparado com as estirpes CPAC 7 e CPAC 15, sendo que esta última apresentou a menor média.

O experimento 2020 apresentou as maiores médias gerais em relação ao experimento 2017/2018, exceto para a massa seca de raiz aos 87 DAP, com destaque principalmente para uma massa seca de nódulos com médias 160 e 52% superiores às observadas no experimento 2017/2018, nas duas épocas de avaliação. É possível que a aplicação adicional de inoculante no sulco de semeadura no experimento de 2020 tenha favorecido a nodulação, porém chama a atenção a elevada massa de nódulos do tratamento sem inoculação (Controle), que parece apontar para outro fator que seria a presença de *Bradyrhizobium* spp. no solo oriundo de experimentos antigos ou a possível presença de estirpes nativas. As estirpes de *Bradyrhizobium* spp. podem permanecer no solo como saprófitas e nodular a soja, reduzindo ou mesmo impedindo a verificação dos benefícios da inoculação pelo tamanho da população estabelecida de rizóbios do solo (HUNGRIA et al., 2017; AMBROSINI et al., 2019; ZILLI et al., 2021). No estudo de Zilli et al. (2010) foi observada uma média de 40,6 mg planta⁻¹ para o Controle (sem inoculação) aos 35 dias após a emergência na média de dois anos agrícolas na região do Cerrado em Roraima.

Outra situação possível é a contaminação do Controle pelo escoamento superficial da água das chuvas podendo levar sedimentos com bactérias para as parcelas sem inoculação.

Os dados de acúmulo de N na soja (Tabela 10) parecem corroborar com os dados de nodulação, pois em ambos os experimentos, o total de N acumulado nas diferentes partes da planta foram superiores com a inoculação da estirpe 29W. Em 2017/2018, essa situação ficou bem marcante, com menores acumulações de N pelas partes das plantas inoculadas com a estirpe CPAC 15.

Para o acúmulo de N nas raízes a CPAC 15 apresentou a menor média entre as estirpes inoculadas. Resultados semelhantes também foram observados para a parte aérea, pois o tratamento com a CPAC 15 esteve entre os que menos acumularam N.

Esses dados estão de acordo com os observados por Araujo et al. (2018), no qual a inoculação com a estirpe 29 W, e também com a estirpe SEMIA 587, apresentou maior acúmulo de N nas raízes e nódulos em relação as inoculações com as estirpes CPAC 7 e CPAC 15.

No experimento de 2020, a inoculação com a estirpe 29 W resultou em incremento significativo no N acumulado nos nódulos, e quanto ao N acumulado nas raízes, a inoculação com a estirpe CPAC 7 resultou em maior média que a estirpe SEMIA 587. Por outro lado, não houve efeito significativo da inoculação quanto ao acúmulo de N na parte aérea ($p < 0,05$).

Como se verificaram contrastes entre os tratamentos quanto a produção de matéria seca e acumulação de N pelas plantas, ou em partes das plantas, fica a dúvida se a avaliação da presença das estirpes inoculadas nos nódulos foi eficiente, pois se uma estirpe pré-existente, ou mesmo nativa, fosse dominante, os diferentes tratamentos deveriam se comportar de forma semelhante.

Tabela 10. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raiz e parte aérea por planta de soja da cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. avaliadas em duas épocas.

Experimento 2017/2018						
Tratamentos	Nódulos		Raiz		Parte aérea	
	43 DAP	87 DAP	43 DAP	87 DAP	43 DAP	87 DAP
----- mg planta ⁻¹ -----						
CONTROLE	0,2 d	7,6 c	6,2 b	11,9 bc	79 b	207 b
CPAC 7	2,2 c	31,8 b	9,2 a	16,6 ab	94 ab	388 a
CPAC 15	0,6 cd	9,2 c	4,7 c	8,0 c	84 b	249 b
SEMIA 587	5,9 b	33,3 ab	8,3 a	15,4 ab	92 b	387 a
29 W	11,2 a	44,4 a	9,2 a	19,0 a	118 a	435 a
Média	4,0	25,3	7,5	14,9	93	333
CV (%)	34,6	34,5	14,5	27,2	20,0	22,3

Experimento 2020						
Tratamentos	Nódulos		Raiz		Parte aérea	
	43 DAP	70 DAP	43 DAP	70 DAP	43 DAP	70 DAP
----- mg planta ⁻¹ -----						
CONTROLE	7,8 b	29,8 b	21,3 a	15,0 ab	238 a	733 a
CPAC 7	11,4 b	42,3 ab	23,9 a	18,7 a	219 a	682 a
CPAC 15	9,1 b	32,7 ab	21,3 a	14,7 ab	253 a	777 a
SEMIA 587	8,4 b	37,0 ab	22,5 a	12,9 b	250 a	692 a
29 W	15,6 a	51,0 a	25,7 a	16,9 ab	260 a	663 a
Média	10,5	38,5	22,9	15,6	244	709
CV (%)	17,4	39,7	15,0	20,7	15,3	16,2

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

4.6 Fixação Biológica de Nitrogênio nos Experimentos em Campo

No experimento 2017/2018, os resultados de contribuição da FBN para as diferentes partes das plantas foram semelhantes, situação em que a inoculação com a estirpe CPAC 15 e o Controle tiveram as menores médias (Tabela 11). Estes tratamentos também apresentaram elevada abundância de $\delta^{15}\text{N}$ que se refletiram em menores taxas de fixação de N_2 (%Nd_{fa}). As estirpes de *B. elkanii*, SEMIA 587 e 29 W juntamente com a CPAC 7 apresentaram as maiores taxas de fixação de N_2 .

No experimento 2020, não foram observados efeitos significativos para o N acumulado na parte aérea e vagem, porém para abundância de $\delta^{15}\text{N}$ na parte aérea, o tratamento SEMIA 587 apresentou maior $\delta^{15}\text{N}$, assim como as vagens, sem diferir do Controle, o que significou as menores quantidades de N fixadas nesse experimento. O tratamento que mais fixou N_2 foi aquele com a inoculação da estirpe 29 W, indicado pela mais baixa abundância natural de ^{15}N , principalmente nas vagens.

No estudo de Zilli et al. (2021), utilizando as mesmas estirpes deste trabalho, separadas e em combinações diferentes em dois anos agrícolas, a inoculação aumentou a %Nd_{fa} apenas no primeiro ano de cultivo, não apresentando diferenças entre estirpes em ambos os anos.

Em relação às plantas-referência amostradas no experimento 2017/2018, usadas como indicadores da abundância natural de ^{15}N do N disponível do solo para a soja, o *Sorghum bicolor* apresentou maior $\delta^{15}\text{N}$ em relação a *Commelina diffusa*, sendo que as demais plantas não tiveram diferenças significativas ($p < 0,05$). No experimento 2020, *Sorghum bicolor* e a *Eleusine indica* apresentaram maior $\delta^{15}\text{N}$ que *Oryza sativa*, tratamentos que não diferiram dos demais.

Em experimentos de campo, variações na abundância natural de ^{15}N são esperadas entre as plantas testemunhas, devido as diferentes capacidades de exploração e absorção de N do solo entre as espécies de plantas, assim como a distribuição espacial das plantas coletadas nos blocos da área experimental.

As plantas que realizam FBN como a soja apresentam valores de abundância de $\delta^{15}\text{N}$ próximo ao N_2 atmosférico, que é considerado como zero unidades de $\delta^{15}\text{N}$ (0,00 ‰). Presume-se que a não fixação de N_2 das plantas de referência crescendo no mesmo local irão acumular N derivado exclusivamente do solo, que é levemente enriquecido em ^{15}N em comparação com o do ar devido ao fracionamento isotópico que ocorre durante as muitas transformações do N no solo (HÖGBERG, 1997; BODDEY et al., 2000; HOBBIÉ; OUIMETTE, 2009). De modo que a diferença entre a abundância de $\delta^{15}\text{N}$ entre a soja e as plantas de referência podem ser interpretadas quantitativamente como a contribuição da FBN (ARAUJO et al., 2018).

Tabela 11. Acúmulo de nitrogênio, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio derivado do ar (%Ndfa) de parte aérea e vagem por planta de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. avaliadas no estágio R5.5 (meio enchimento de grãos), e abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas referência.

Experimento 2017/2018					
Tratamentos	N acumulado		$\delta^{15}\text{N}$		Ndfa
	Parte aérea	Vagem	Parte aérea	Vagem	
	----- mg planta ⁻¹ -----		----- ‰ -----		---- % ----
CONTROLE	116 b	91 b	4,13 a	3,44 a	59 c
CPAC 7	203 a	185 a	1,61 bc	1,04 b	79 ab
CPAC 15	133 b	116 b	2,96 ab	2,10 ab	69 bc
SEMIA 587	206 a	181 a	1,15 c	0,81 b	82 a
29 W	236 a	199 a	1,55 c	0,92 b	80 ab
Média	179	155	2,28	1,66	74
CV (%)	25,2	26,3	24,0	31,6	11,0
Plantas referência $\delta^{15}\text{N}$					
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Eleusine indica</i>	<i>Urochloa brizantha</i>	<i>Commelina diffusa</i>	Média (‰)	
				11,506	
----- ‰ -----				CV (%)	
13,71 a	11,52 ab	10,96 ab	9,83 b	19,2	
Experimento 2020					
Tratamentos	N acumulado		$\delta^{15}\text{N}$		Ndfa
	Parte aérea	Vagem	Parte aérea	Vagem	
	----- mg planta ⁻¹ -----		----- ‰ -----		---- % ----
CONTROLE	265 a	468 a	1,82 b	1,36 a	79 c
CPAC 7	245 a	437 a	1,61 b	0,56 c	83 b
CPAC 15	274 a	503 a	1,69 b	0,95 b	81 bc
SEMIA 587	264 a	427 a	3,32 a	1,63 a	73 d
29 W	230 a	433 a	1,15 b	-0,07 d	88 a
Média	256	454	1,92	0,88	81
CV (%)	22,0	18,4	32,6	28,4	2,9
Plantas referência $\delta^{15}\text{N}$					

Continua...

Continuação da Tabela 11.

Experimento 2020					
<i>Eleusine indica</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Digitaria sanguinalis</i>	<i>Ipomoea acuminata</i>	<i>Oryza sativa</i>	Média (‰)
-----	-----	-----	-----	-----	CV (%)
13,33 a	13,06 a	12,35 ab	12,10 ab	10,82 b	9,8

Semente do experimento 2017/2018 $\delta^{15}\text{N} = 1,26\text{‰}$; Semente do experimento 2020 $\delta^{15}\text{N} = -1,09\text{‰}$; Médias seguidas das mesmas letras na coluna ou linha não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Alguns trabalhos apontam que a proporção de N derivada de fixação variaram de 35 a 86%, os valores mais altos vieram de estudos conduzidos no Brasil, onde estirpes de *Bradyrhizobium* spp. adaptadas foram selecionadas para as condições tropicais, onde o conteúdo de N mineral do solo é relativamente baixo (ALVES et al., 2003; HUNGRIA et al., 2005a, b; SALVAGIOTTI et al., 2008). Estima-se que globalmente, apenas a soja represente 77% da FBN de todas as culturas de leguminosas (HERRIDGE et al., 2008).

4.7 Produtividade e Acúmulo de Massa Seca nos Experimentos em Campo

O acúmulo de massa seca de diferentes partes da soja e a produtividade de grãos, na ocasião da colheita, são observados na Tabela 12. No experimento 2017/2018, o tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 587 proporcionou maior acúmulo de material senescente em relação ao inoculado com a estirpe 29 W e o Controle, e maior produtividade de grãos que o Controle, sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si. As folhas senescentes tendem a aumentar com o tempo, pois as folhas translocam os fotoassimilados para o enchimento dos grãos até a maturidade fisiológica, e em consequência disso as folhas senescem e se desprendem das plantas.

O baixo efeito da inoculação na produtividade da soja está ligado a considerável nodulação e FBN apresentadas no tratamento sem inoculação (Controle), efeito que foi maior na produtividade no experimento 2020, em que a massa de nódulos foi proporcional a maioria dos tratamentos inoculados (Tabela 9 e 11). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Zilli et al. (2021) que não observaram efeitos da inoculação na produtividade de grãos, FBN e massa seca de nódulos no segundo ano de cultivo, devido ao aumento da população de *Bradyrhizobium* spp. ocasionado pelo cultivo anterior.

Tabela 12. Massa seca de nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e produtividade de grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

Experimento 2017/2018									
Tratamentos	Raízes	Nódulos	Folhas senescentes				R. colheita	Produtividade	
			80 DAP	97 DAP	105 DAP	118 DAP	Total		133 DAP
----- kg ha ⁻¹ -----									
CONTROLE	720 a	61 b	109 b	86 b	89 b	539 b	823 c	3673 ab	2348 b
CPAC 7	691 a	284 a	125 b	114 ab	87 b	882 a	1209 ab	3170 b	3498 ab
CPAC 15	782 a	75 b	104 b	164 ab	90 b	778 ab	1136 abc	3496 ab	3414 ab
SEMIA 587	731 a	318 a	153 ab	177 a	174 a	854 ab	1359 a	3533 ab	3821 a
29 W	801 a	382 a	181 a	122 ab	94 b	607 ab	1005 bc	3943 a	3082 ab
Média	745	224	135	133	107	732	1106	3563	3233
CV (%)	26,1	34,6	30,6	21,7	53,0	32,9	21,2	12,6	28,5
Experimento 2020									
Tratamentos	Raízes	Nódulos	Folhas senescentes			R. colheita	Produtividade		
			79 DAP	86 DAP	94 DAP	Total		99 DAP	
----- kg ha ⁻¹ -----									
CONTROLE	354 ab	178 ab	66 a	577 a	800 a	1478 a	1750 a	3842 a	
CPAC 7	404 a	157 b	106 a	706 a	703 a	1555 a	1670 a	3868 a	
CPAC 15	346 ab	170 b	65 a	653 a	731 a	1486 a	1867 a	4323 a	
SEMIA 587	283 b	182 ab	57 a	589 a	732 a	1413 a	1877 a	4249 a	
29 W	339 ab	249 a	107 a	815 a	599 a	1564 a	1893 a	4309 a	
Média	345	187	80	668	713	1499	1811	4118	
CV (%)	21,9	29,6	77,5	41,4	29,8	13,6	11,9	12,6	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Diferenças significativas na massa seca de raiz da soja somente foram observadas no experimento 2020, em que a inoculação com a estirpe CPAC 7 proporcionou média maior que a observada com a inoculação da estirpe SEMIA 587. Para a massa de nódulos, a inoculação com 29 W resultou em melhor desempenho dessa variável nos dois experimentos. É importante destacar que nódulos e raízes somam quantidades de N subterrâneas que induzem emissões de N_2O na cultura da soja, enquanto, folhas senescentes, caules e cascas somam quantidades de N na superfície com mesma ação indutora, embora a contribuição dos resíduos subterrâneos seja maior (MACHADO et al., 2021).

O material vegetal senescente foi constituído principalmente de folhas e pecíolos que se desprendiam naturalmente das plantas ao senescer. No experimento 2020, não houve efeito de tratamento ($p < 0,05$) nas diferentes épocas de coleta e no total acumulado, como também para os resíduos da colheita e produtividade de grãos.

A quantidade de material senescente no experimento de 2020 aumentou ao longo das coletas, devido a uniformidade da senescência com o avanço da fase reprodutiva da planta.

Apesar do experimento 2020 ter sido composto por uma população menor de plantas por hectare, este apresentou maior acúmulo médio de folhas senescentes 1.499 kg ha^{-1} devido a uniformidade na senescência. Até a colheita realizada aos 99 DAP, todas as folhas já tinham desprendido das plantas, fato que proporcionou uma menor quantidade de resíduos da colheita, efeito esse favorecido pela aplicação de herbicida dessecante e pela falta de chuvas 3 semanas antes da colheita, o que resultou em baixa umidade relativa do ar (Figura 12a). Ao contrário, no experimento 2017/2018 (Figura 11a) houve abortamento de parte das vagens em função das altas temperaturas e umidade relativa elevada na fase reprodutiva, proporcionando a perda na uniformidade de maturação pela menor quantidade de vagens que funcionam como dreno (JIANG; EGLI, 1993; LIU; JENSEN; ANDERSEN, 2004; LIU, et al., 2011). Isso influenciou no maior acúmulo de resíduos da colheita e consequentemente menor acúmulo de material senescente e produtividade de grãos deste experimento. Porém, ao somar o total de resíduos da parte aérea depositado no solo, o experimento 2017/2018, com maior população de plantas, apresentou maior quantidade de resíduos ou 4.669 kg ha^{-1} , contra 3.310 kg ha^{-1} em 2020.

4.8 Acúmulo e Exportação de Nitrogênio nos Experimentos em Campo

No experimento 2017/2018, o acúmulo de N (Tabela 13) nas partes subterrâneas das plantas foi influenciado pela inoculação, sendo que a inoculação com a estirpe 29 W aumentou a quantidade de N nas raízes e nódulos da soja, não diferindo da inoculação com a SEMIA 587, e com a inoculação com a estirpe CPAC 7 para o N acumulado nas raízes. No experimento de 2020, a inoculação com a estirpe CPAC 7 resultou em maior acúmulo de N nas raízes em relação a uso da SEMIA 587, sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si.

Tabela 13. Acúmulo de nitrogênio nos nódulos, raízes, folhas senescentes em diferentes épocas de coleta, resíduos da colheita, e grãos de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

Experimento 2017/2018									
Tratamentos	Raízes	Nódulos	Folhas senescentes				R. colheita	Grãos	
			80 DAP	97 DAP	105 DAP	118 DAP	Total		133 DAP
			----- kg ha ⁻¹ -----						
CONTROLE	4,8 bc	3,0 c	1,7 b	1,3 b	1,4 b	8,4 b	12,9 b	65,3 b	143 b
CPAC 7	6,6 ab	12,7 b	2,0 ab	1,9 ab	1,4 b	14,6 a	20,0 a	52,4 b	240 a
CPAC 15	3,2 c	3,7 c	1,8 b	2,6 a	1,4 b	13,8 ab	19,7 a	47,2 b	216 ab
SEMIA 587	6,2 ab	13,3 ab	2,5 ab	2,9 a	2,8 a	14,0 ab	22,3 a	47,3 b	241 a
29 W	7,6 a	17,8 a	2,9 a	2,0 ab	1,6 b	10,0 ab	16,4 ab	92,7 a	206 ab
Média	5,7	10,1	2,2	2,1	1,7	12,2	18,2	61,0	209
CV (%)	27,2	34,5	30,7	19,0	53,3	37,2	25,6	29,2	27,3
Experimento 2020									
Tratamentos	Raízes	Nódulos	Folhas senescentes				R. colheita	Grãos	
			79 DAP	86 DAP	94 DAP	Total	99 DAP		
			----- kg ha ⁻¹ -----						
CONTROLE	3,3 ab	6,6 b	1,1 a	9,6 a	14,1 a	24,8 a	6,9 b	254 a	
CPAC 7	4,1 a	9,3 ab	1,6 a	11,0 a	11,4 a	24,0 a	6,4 b	215 a	
CPAC 15	3,2 ab	7,2 ab	1,0 a	10,0 a	12,1 a	23,1 a	7,5 ab	226 a	
SEMIA 587	2,8 b	8,1 ab	1,0 a	10,1 a	13,3 a	24,3 a	6,9 b	239 a	
29 W	3,7 ab	11,2 a	1,5 a	12,1 a	10,0 a	23,6 a	8,3 a	208 a	
Média	3,4	8,5	1,2	10,5	12,2	24,0	7,2	228	
CV (%)	20,7	39,7	67,9	16,6	37,4	15,3	13,9	16,6	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

Diferenças no total de N depositado no solo pela senescência das folhas foram observadas somente no experimento de 2017/2018, sendo o tratamento Controle o que apresentou as menores quantidades, embora semelhantes estatisticamente ao observado com a inoculação da soja com a estirpe 29 W. O total de N depositado no solo pela senescência das folhas foram menores que o observado por Zotarelli et al. (2012) que verificaram uma entrada de 30 kg N ha⁻¹ de folhas senescentes de soja algumas semanas antes da colheita, especialmente no experimento de 2017/2018. Como discutido anteriormente, diferenças proporcionadas pelo ciclo da cultura, densidade de plantas e por efeitos climáticos, assim como a presença de pragas, podem justificar esses contrastes com experiências anteriores. Isso explica também a grande quantidade de N encontrada nos resíduos de colheita, aos 133 DAP no experimento de 2017/2018, cerca de 10 vezes mais do que o quantificado no experimento de 2020 com metade do estande de plantas.

No experimento 2017/2018, a inoculação com as estirpes SEMIA 587 e CPAC 7 resultou em maior exportação de N pela colheita, comparada ao Controle, já que estas estirpes proporcionaram elevadas produtividades. No experimento de 2020, o efeito de tratamento não foi observado, o que também já foi observado em outros ambientes (ZILLI et al., 2021). Devido ao alto teor de proteína nos grãos de soja, em torno de 40%, altas quantidades de N são exportadas nos grãos. Estima-se que, em média, 215 kg de N são exportados de cada hectare de soja colhidos no Brasil (ARAUJO et al., 2018), o que está próximo do observado nos dois experimentos no presente estudo, em média, 209 e 228 kg ha⁻¹ nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente. Esta variável depende da produtividade (Tabela 12) e do teor de N nos grãos que foi em média 6,4% no experimento 2017/2018, e 5,5% no experimento 2020. Araujo et al. (2018) observou um teor de N de 6,5% nos grãos de soja.

Os resíduos da colheita no experimento 2017/2018 contribuíram com maior quantidade de N para o solo cultivado com soja, seguidos das folhas senescentes. Da porção subterrânea, os nódulos contribuíram com a maior proporção de N. No experimento 2020 houve mais N acumulado no material senescente, seguido pelos nódulos, resíduos da colheita e por último a raiz.

4.9 Balanço de Nitrogênio nos Experimentos em Campo

A inoculação da soja resultou em maior acumulação de N na planta no experimento 2017/2018, porém esse efeito não foi observado no experimento seguinte, em 2020 (Tabela 14). Considerando a média dos resultados dos dois experimentos, cada tonelada de grãos produzida implicou em um acúmulo de 80,5 (±5,4) kg de N na planta, o que é muito próximo do encontrado por Zotarelli et al (2012) para cultivares plantados no Paraná. No experimento 2017/2018, o Controle proporcionou menor acumulação de N, não sendo diferente do tratamento inoculado com a estirpe CPAC 15, e o mesmo aconteceu em relação ao N derivado da FBN (Tabela 11), indicando que nesse primeiro experimento, o acúmulo de N na planta era mais dependente do processo de fixação de N₂. No experimento 2020, a contribuição da FBN foi acima dos 70% em todos os tratamentos, e talvez isso justifique a ausência de diferença entre tratamentos na acumulação de N na planta.

Em 2017/2018, os tratamentos inoculados apresentaram um maior acúmulo de N nos tecidos da soja provenientes da FBN, com média de 231 kg ha⁻¹, e que representou um aumento de 64% em relação ao Controle. No experimento de 2020, a quantidade média de N derivada da FBN foi de 219 kg N ha⁻¹, mas neste caso, a inoculação não promoveu diferenças no total de N da planta. Por outro lado, o tratamento Controle foi o que mais dependeu do N do solo no experimento de 2017/2018, porém diferente apenas do tratamento com a estirpe SEMIA 587, em termos estatísticos (Tabela 14). No experimento de 2020, o tratamento Controle seguiu como um dos mais dependentes pelo N do solo, porém o tratamento com a estirpe SEMIA 587

foi o que mais acumulou N do solo. A utilização de N do solo é um processo normal para as plantas, mesmo para aquelas que podem fixar muito N_2 , como a soja. De fato, havendo N mineral no solo em quantidade suficiente para atender a demanda da planta, o sistema fixador de N_2 praticamente cessa, muito embora uma oferta inicial de N mineral no solo possa promover condições para alta nodulação e desempenho da FBN para a cultura (COOPER; SCHERER, 2012). De acordo com Alves et al. (2003), o uso de preparo do solo para o plantio da soja justificaria maior disponibilidade de N mineral no solo e um atraso na formação dos nódulos da soja e uma menor %Ndfa na planta em comparação a um sistema onde se usa o plantio direto, embora a quantidade total de nódulos na fase de enchimento de grãos acabe se equiparando nos dois sistemas, tudo isso para plantas inoculadas com produto comercial no plantio.

O balanço de N do sistema é um aspecto relevante quanto ao papel da FBN em cultivos de leguminosas. Em ambos os experimentos, o tratamento controle resultou em maior retirada de N do sistema pelos grãos do que a FBN foi capaz de aportar. A situação foi mais crítica no experimento de 2020, quando apresentou alta produtividade, mas a %Ndfa foi inferior ao necessário, resultando em uma perda de 21 kg N ha^{-1} do solo. As plantas inoculadas com a estirpe CPAC15 também incorreram em similar resultado, com balanços negativos de N, pouco abaixo de 10 kg N ha^{-1} nos dois anos de experimentação. Em contrapartida, a inoculação com a estirpe 29W proporcionou maior incremento em N na planta para ser depositado no solo na forma de resíduos, além de apresentar alta FBN, o que resultou em um balanço positivo de 68 e 15 kg ha^{-1} de N adicionados ao solo nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente.

A soja é a cultura que mais acumula N nos grãos, e responsável pela maior exportação desse nutriente do sistema. De acordo com estudo de Alves et al. (2006) o total de N acumulado nos grãos de soja correspondeu a cerca de 83 a 86% do total de N acumulado na parte aérea. As quantidades de N derivadas da FBN foram elevadas, com variação entre 176 e 193 kg ha^{-1} de N. A grande quantidade de N alocada nos grãos e exportada com a colheita resultou em um balanço de N negativo para a cultura da soja, em torno de -8 kg ha^{-1} . No segundo ano, o balanço de N para a cultura foi positivo e representou uma entrada de N para o sistema de 10 kg ha^{-1} , que foi relacionado à menor produtividade da cultura e à alta contribuição da FBN.

No presente estudo, percentuais de FBN, similares ou um pouco mais baixos que os de 2020, foram suficientes para equilibrar a exportação de N nos grãos no experimento de 2017/2018, mas no experimento 2020, os percentuais de FBN tiveram que ser maiores devido a maior exportação de N nos grãos, que incrementou de 209 para 228 kg N ha^{-1} (Tabela 13) enquanto que o N acumulado na planta reduziu de 304 para 271 kg N ha^{-1} (Tabela 14), ou seja, no primeiro experimento, a soja apresentava, em média, um índice de colheita de N menor do que no experimento 2020, e em média o balanço de N foi positivo no primeiro e negativo no segundo experimento. Quando o índice de colheita de N for superior à %Ndfa, o balanço de N do solo será negativo (ALVES et al., 2003).

Quando a exportação de N nos grãos colhidos é maior que as entradas de N, promoverá a perda de C do solo, tornando o sistema insustentável ao longo do tempo (URQUIAGA et al., 2005).

Tabela 13. Nitrogênio total acumulado, nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e do solo, nitrogênio depositado no solo e balanço de N pela FBN de soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

Experimento 2017/2018					
Tratamentos	N acumulado pela soja	N derivado da FBN	N derivado do solo	N depositado no solo	Balanço de N
	----- kg ha ⁻¹ -----				
CONTROLE	229 b	141 b	88 a	86 b	-2 c
CPAC 7	332 a	260 a	71 ab	92 b	20 bc
CPAC 15	290 ab	208 ab	81 ab	74 b	-8 c
SEMIA 587	330 a	271 a	59 b	89 b	30 b
29 W	340 a	273 a	67 ab	135 a	68 a
Média	304	231	73	95	22
CV (%)	19,5	22,0	25,5	20,1	63,0
Experimento 2020					
Tratamentos	N acumulado pela soja	N derivado da FBN	N derivado do solo	N depositado no solo	Balanço de N
	----- kg ha ⁻¹ -----				
CONTROLE	295 a	233 a	63 ab	42 a	-21 cd
CPAC 7	259 a	216 a	43 cd	44 a	1 ab
CPAC 15	267 a	217 a	50 bc	41 a	-9 bc
SEMIA 587	281 a	206 a	75 a	42 a	-33 d
29 W	255 a	223 a	31 d	47 a	15 a
Média	271	219	52	43	-9
CV (%)	13,6	13,9	18,5	12,6	-122,6

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

A determinação da proporção de N derivado da FBN e a exportação de N nos grãos colhidos, determina se a FBN na soja contribuiu em N para o solo, ou promoveu a perda de N do solo. Portanto, é importante quantificar as entradas via FBN e a exportação para julgar a sustentabilidade da cultura da soja (ARAUJO et al., 2018).

Salvagiotti et al. (2008) ao revisar diversos trabalhos, constataram acúmulo de N nos grãos de soja entre 122 e 184 kg ha⁻¹, e a FBN desde 0 a 337 kg ha⁻¹ de N, com média de 111 kg ha⁻¹ de N. Os valores mais baixos de FBN foram associados a solos com alto teor de nitrato, ou elevada acidez do solo. A FBN atingiu o potencial máximo quando foram usadas tecnologias como, inoculantes, variedade de soja de alto rendimento, e quando não houve limitações de água e outros nutrientes. O saldo de N para o solo foi negativo em cerca de 80% de todos os trabalhos, com média de -40 kg N ha⁻¹. É importante mencionar, no entanto, que o balanço de N depende de boas estimativas de N nas diferentes partes da planta, e um dos maiores desafios é quantificar o N que entra no solo pelo sistema radicular. Utilizando-se a técnica de traçador isotópico com ¹⁵N, tem-se verificado que a contribuição da FBN é frequentemente subestimada porque o N incluído nas raízes, nódulos, exsudatos e rizodeposição não são contabilizados em sua totalidade (UNKOVICH; PATE, 2000). Estima-se que 24% do N total da planta estejam alocados nestas partes subterrâneas, compondo raízes mais finas e exsudatos de raízes que não são recuperados com a amostragem convencional do solo (ROCHESTER et al., 1998). Como a técnica isotópica é de difícil aplicação e vem sendo criticada, esse é um assunto que ainda está em aberto.

4.10 Emissão de N₂O nos Experimentos em Campo

Ao longo do ciclo da soja que finalizou aos 133 e 99 dias após o plantio (DAP), nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, observou-se que os maiores fluxos de N₂O ocorreram até os 30 DAP. O maior pico deste período foi atribuído ao tratamento onde a inoculação foi feita com a estirpe 29 W com 484 $\mu\text{g N m}^2 \text{ h}^{-1}$ em 2017/2018, e ao Controle não inoculado, com 544 $\mu\text{g N m}^2 \text{ h}^{-1}$ em 2020. Estes altos fluxos iniciais devem-se, provavelmente, ao preparo do solo, que proporcionou o aumento da mineralização de N, representado pelo aumento dos teores de amônio e nitrato do solo (Figura 11d e 12d) na primeira semana de cultivo. Como o dreno pelas plantas era praticamente inexistente e foi necessário realizar irrigações entre os eventos de precipitação, houve condições que favoreceram a nitrificação e desnitrificação, esta última indicada pelo aumento do EPSA (Figura 11a e 12a). A umidade do solo elevada com alta disponibilidade de N mineral é uma combinação para alta emissão de N₂O nos solos (LIU et al., 2017; KUANG et al., 2019). Com o preparo do solo, a incorporação dos resíduos vegetais ao solo aumenta as emissões de N₂O (HUANG et al., 2004), já que a mineralização da matéria orgânica fresca pode fornecer N mineral para a desnitrificação (LIU et al., 2010), especialmente nas primeiras duas semanas após o evento (BAGGS et al., 2000).

O nível de umidade do solo interfere na composição da comunidade de microrganismos desnitrificadores do solo, sendo *Bradyrhizobium* um dos gêneros predominantes, respondendo por cerca de 50% do total nos tratamentos com 50%, 75% e 100% do EPSA, indicando que sua viabilidade aumenta substancialmente se a umidade do solo for maior que 50% do EPSA (QIN et al., 2019). Logo, a umidade mais alta do solo favorece o crescimento e dispersão do *Bradyrhizobium* spp. (BARTHELEMY-DELAUX et al., 2014), conferindo uma vantagem adaptativa a esse gênero com representantes capazes de desnitrificar (SAEKI et al., 2017; QIN et al., 2021).

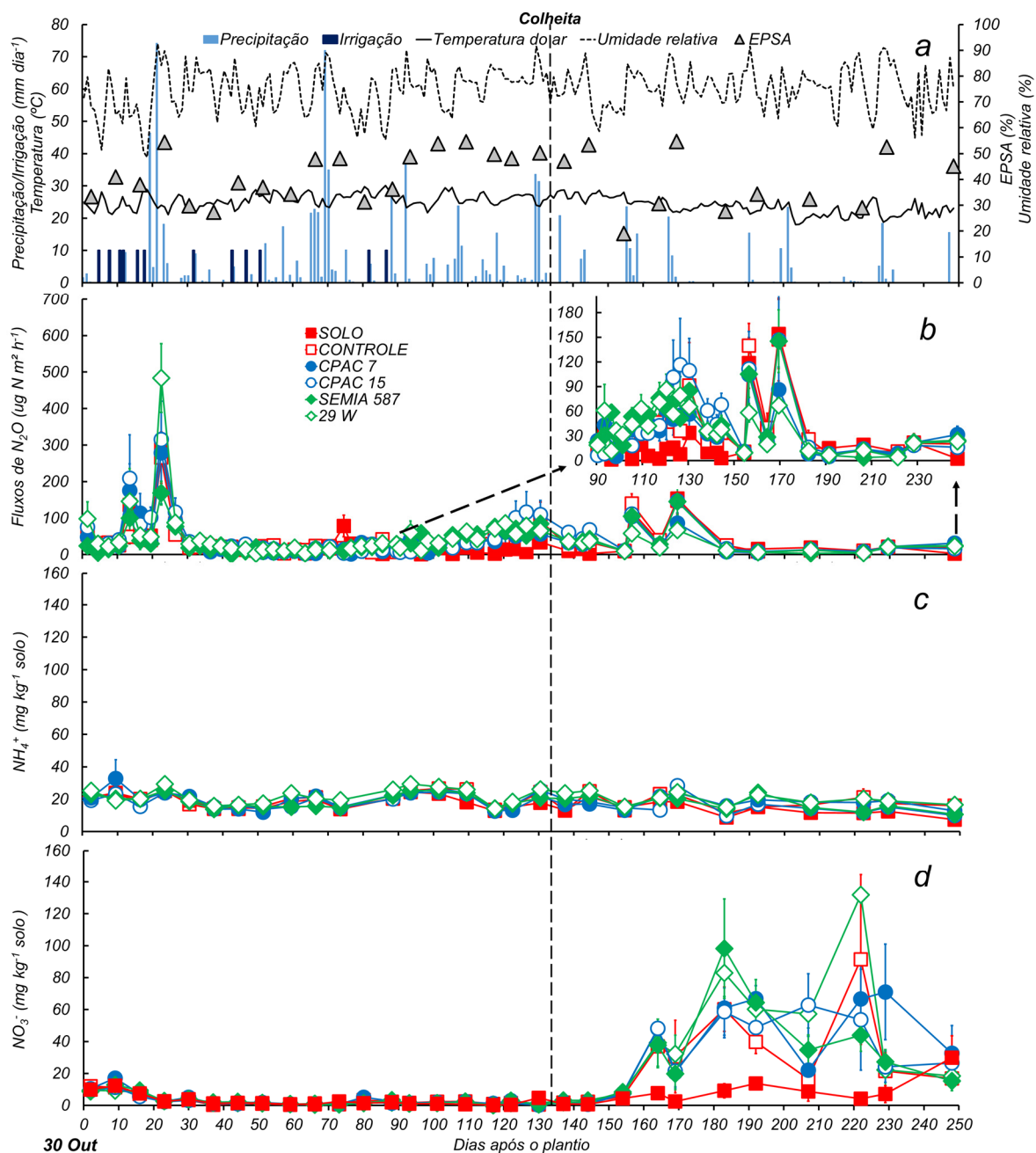


Figura 11. Precipitação, irrigação, temperatura do ar, umidade relativa e espaço poroso saturado por água (EPSA) (a), fluxos de N₂O e detalhe da época de aumento dos fluxos (b), teores de amônio (c) e nitrato (d) no solo durante o período de 247 dias após o plantio da soja cultivar TMG 7062 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. no experimento 2017/2018. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

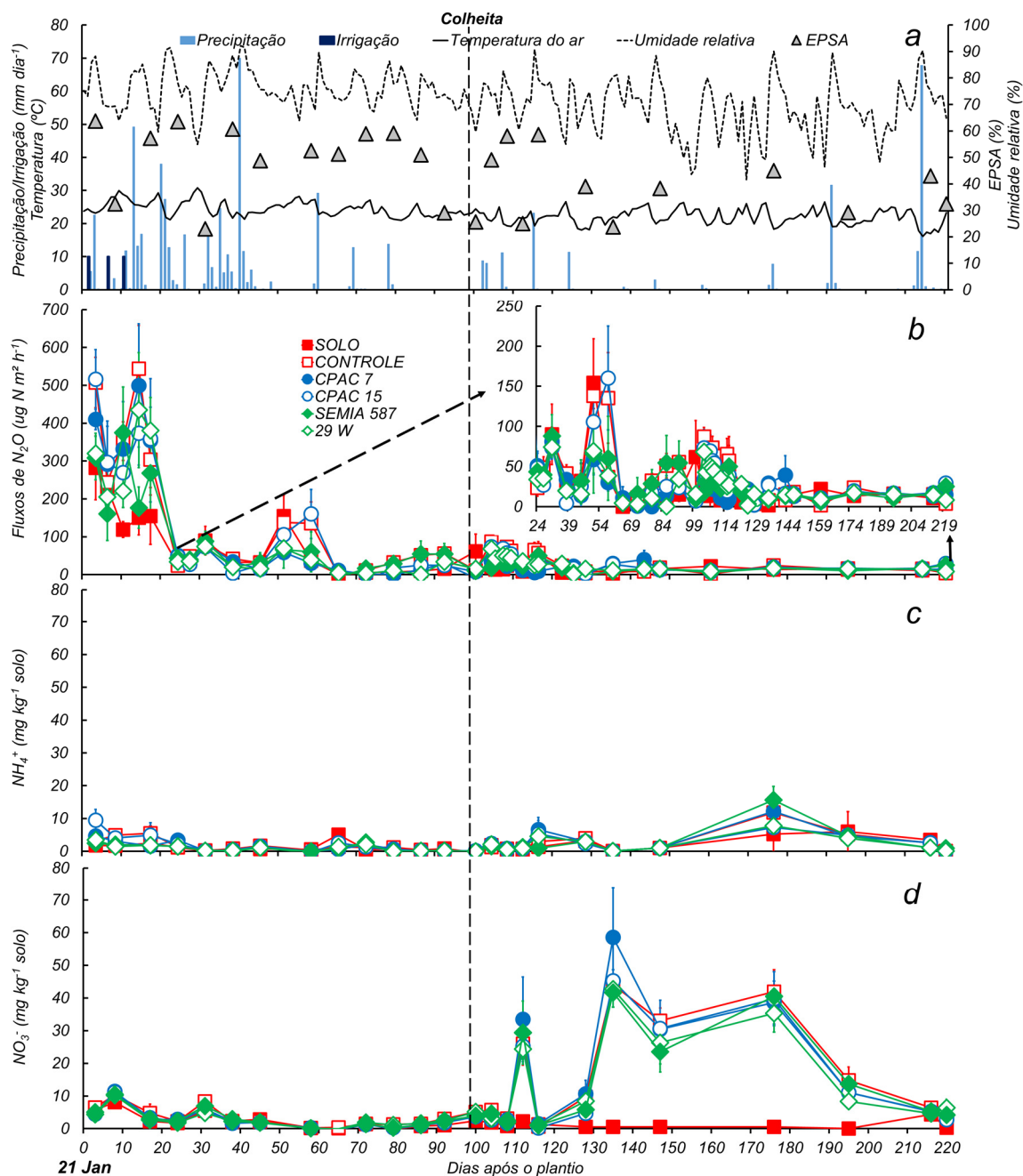


Figura 12. Precipitação, irrigação, temperatura do ar, umidade relativa e espaço poroso saturado por água (EPSA) (a), fluxos de N_2O e detalhe da época de aumento dos fluxos (b), teores de amônio (c) e nitrato (d) no solo durante o período de 220 dias após o plantio da soja cultivar M5917 inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. no experimento 2020. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

As câmaras de monitoramento de emissões de N_2O do solo, sem a presença da planta e resíduos da soja, apresentaram a mesma tendência de emissão dos demais tratamentos no início de ambos monitoramentos, indicando que é mais um efeito das atividades de preparo do solo e de desnitrificadores presentes no solo, do que algum efeito do *Bradyrhizobium* spp. inoculado. Depois desse período inicial, houve uma redução nos fluxos de N_2O e do N mineral na fase vegetativa e início da fase reprodutiva da soja no experimento 2017/2018. No experimento 2020, houve duas fases de aumento nos fluxos médios de N_2O com 88 e 100 μg N m⁻² h⁻¹ aos

31 e 51 DAP, respectivamente, devido ao leve aumento no nitrato e elevadas precipitações no período, seguido da estabilização dos fluxos pela maior absorção de N e precipitações mais escassas (ZHANG et al., 2011; GIAMBALVO et al., 2018).

A partir dos estádios reprodutivos quando a planta já acumulou todo o N necessário para finalizar o enchimento de grãos, algumas partes da planta iniciam a senescência, principalmente dos nódulos que liberam o nitrogênio orgânico que é mineralizado para amônio (NH_4^+), seguido pela nitrificação e desnitrificação que produzem N_2O (ITAKURA et al., 2013). Esse efeito não foi detectado no N mineral, possivelmente pela dificuldade de amostragem de sítios específicos onde o processo ocorre, mas pode se observar que a partir dos 90 e 72 DAP, nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, houve uma tendência de aumento nos fluxos de N_2O , que são observados nos detalhes das Figuras 11b e 12b. O experimento de Inaba et al. (2012) com ^{15}N indicou que as emissões de N_2O vêm do nitrogênio fixado nos nódulos, sendo a sua decomposição a principal fonte de N_2O na rizosfera da soja (SÁNCHEZ; MINAMISAWA, 2019).

A fase de enchimento de grãos é o período mais importante para as emissões de N_2O de todo o ciclo de crescimento da soja, representando de 68% até 94% das emissões totais (YAN; CAI, 2005; CIAMPITTI et al., 2008).

O período monitorado após a colheita que compreendeu dos 133 aos 247 DAP, e dos 99 aos 220 DAP nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, os fluxos de N_2O se intensificaram, principalmente aos 156 e 169 DAP no experimento 2017/2018 com fluxos médios de 106 e 124 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Estes fluxos estão ligados as precipitações ocorridas após 12 dias sem chuvas ocasionando o aumento do EPSA, e dos teores de nitrato no solo. Com a diminuição do EPSA mais oxigênio é difundido nos poros do solo, levando o aumento da nitrificação, portanto, produzindo mais NO_3^- , que por sua vez pode levar a produção de N_2O ou N_2 por desnitrificação após o umedecimento do solo (LI et al., 2013).

As demais coletas neste experimento apresentaram baixos fluxos, mesmo com os altos teores de nitrato (Figura 11d), o que se explicaria pela baixa umidade do solo na ocasião das amostragens. De acordo com Bueno et al. (2017) para o processo de desnitrificação do *Bradyrhizobium japonicum* o mais importante é a condição de anaerobiose do que a disponibilidade do nitrato para ocorrer a expressão da enzima nitrato redutase, embora sem o NO_3^- , não se esperam emissões elevadas.

No experimento de 2020, após a colheita ocorreram picos atribuídos ao tratamento Controle de 156 e 65 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ aos 100 e 104 DAP, respectivamente, os demais tratamentos tiveram o mesmo comportamento do Controle, e a partir de então os fluxos foram reduzindo ao longo dos dias, e mantendo-se estáveis até o final do monitoramento.

Gomes et al. (2009) observaram os maiores fluxos diários de N_2O no solo imediatamente após eventos de precipitação, principalmente no 18º e 25º dia após a colheita, quando o EPSA era alto, a disponibilidade de oxigênio no solo era baixa, sendo que o teor de NO_3^- não foi limitante. De acordo com Ciampitti et al. (2008) o período de maiores emissões de N_2O foram cerca de 20 dias antes e 20 dias após a colheita. Os fluxos de N_2O na soja também foram monitorados por Shah (2014) que observaram duas fases de aumento nos fluxos, a primeira aos 25 dias após a formação dos nódulos seguido da diminuição dos fluxos após 5 dias, e a segunda no início da maturidade fisiológica da soja.

A emissão acumulada de N_2O no experimento 2017/2018 foi maior no período após a colheita representando 38% da emissão total, e as emissões dos primeiros 30 DAP representaram 28%. No experimento 2020 a fase mais importante passou a ser até os 30 DAP que representou 59% das emissões totais, seguido do período de pós-colheita com 21%, indicando que qualquer forma de manejo que minimizem os impactos do N_2O deve ser adotada nestes períodos. O período pós-colheita representou apenas 30% da duração total do

experimento, e as emissões desse período representaram 28% das emissões totais de N₂O (CIAMPITTI et al., 2008).

A adição de resíduos de leguminosas para o solo estimula a atividade microbiana e, dessa forma, aumenta as emissões de N₂O devido a mineralização rápida de N de resíduos de leguminosas resultando no aumento no N mineral do solo (NH₄⁺ e NO₃⁻) fornecendo substrato para a produção de N₂O. O aumento do consumo de oxigênio disponível durante a decomposição das leguminosas aumenta a ocorrência de microsítios anaeróbicos e, portanto, a produção de N₂O por desnitrificação (KHALIL; BAGGS, 2005; CIAMPITTI et al., 2008).

Quanto aos fatores que condicionam a emissão de N₂O, observa-se que os teores de amônio (Figura 11c e 12c) pouco influenciaram nos picos de emissão, o que indica que a principal fonte de N₂O foi o processo de desnitrificação. Durante todo o período de estudo os teores variaram entre 7 e 33 mg kg⁻¹, e de 0,3 a 16 mg kg⁻¹ de solo, nos experimentos 2017/2018 e 2020, respectivamente, apresentando comportamento semelhante para todos os tratamentos. No experimento 2017/2018 o teor médio de amônio no solo foi de 18 mg kg⁻¹, bem maior que no experimento 2020 que foi de 2,4 mg kg⁻¹ de solo. O processo de nitrificação ficou nítido no início do experimento e após a colheita pela existência de maiores concentrações de nitrato no solo nestas fases.

No estudo de Yang e Cai (2005) foram observados aumentos nas taxas de mineralização e nitrificação, o que ocorreu devido ao início da senescência das plantas e, da decomposição das raízes e nódulos da soja no solo.

Quanto ao nitrato no solo no experimento 2017/2018, os teores variaram entre 0,03 e 17 mg kg⁻¹, e no experimento 2020 estiveram entre 0,09 e 11 mg kg⁻¹ durante o ciclo da soja, sem diferenças entre os tratamentos. Após a colheita as concentrações se elevaram até 132 mg kg⁻¹ no experimento 2017/2018, e 59 mg kg⁻¹ no experimento 2020. Na média dos tratamentos com planta, os aumentos nos teores de nitrato no solo dos experimentos de 2017/2018 e 2020, respectivamente, foram 4,3 e 11,6 vezes o observado no tratamento sem planta (Solo), após a colheita da soja.

Os resultados indicam que a possível transferência de N para o solo pela cultura da soja durante as fases vegetativas e reprodutivas não é suficiente para elevar significativamente as concentrações de N mineral do solo, pois esse efeito é constatado somente após a colheita. As quantidades de N na massa vegetal deixada no sistema após a colheita foram mais expressivas no experimento de 2017/2018 do que em 2020, liberando uma maior quantidade de N no primeiro ano, que foi convertido para a forma nítrica.

Os efeitos da inoculação não foram significativos para a emissão acumulada de N₂O que considera todo o período experimental (Tabela 15), nem para a emissão relativa ao período em que se iniciou a deposição dos resíduos (a partir da fase de deposição das folhas senescentes). Exceção é feita para o total de N₂O acumulado no experimento 2020 em que o tratamento sem inoculação (Controle) apresentou emissão maior que o tratamento com inoculação com a estirpe SEMIA 587, e para o período de emissões dos resíduos quando o Controle foi superior a inoculação com a estirpe CPAC 7, não diferindo dos demais tratamentos.

De acordo com a análise de qPCR nos nódulos (Figura 13) da soja do experimento 2020 não foram observados a presença dos genes de desnitrificação *nirK* e *nosZ*, indicando que as emissões de N₂O foram proporcionadas pelos microrganismos desnitrificantes do solo, já que foram observados a presença dos genes *nirK* e *nosZ* no solo (Figura 14). Desta forma, podemos concluir indiretamente que a inoculação com as estirpes comerciais não foi eficiente para colonizar os nódulos da soja.

Tabela 14. Emissão acumulada de N₂O (g N-N₂O ha⁻¹), intensidade de emissão (g N-N₂O kg grãos⁻¹) e fator de emissão (%) da soja cultivar TMG 7062 no experimento 2017/2018 e cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

Experimento 2017/2018						
Tratamentos	Emissão acumulada		Intensidade de emissão		Fator de emissão	
	Total	Resíduo	Total	Resíduo	Total	Resíduo
	--- g N-N ₂ O ha ⁻¹ ---		-- g N-N ₂ O kg grãos ⁻¹ --		----- % -----	
SOLO	2048 a	1065 a	-	-	-	-
CONTROLE	2198 a	1483 a	1,07 a	0,70 a	0,100 a	0,456 a
CPAC 7	2096 a	1246 a	0,61 ab	0,35 b	0,166 a	0,198 a
CPAC 15	2592 a	1588 a	0,88 ab	0,50 ab	0,730 a	0,702 a
SEMIA 587	2094 a	1518 a	0,57 b	0,40 b	0,042 a	0,518 a
29 W	2267 a	1266 a	0,73 ab	0,41 b	0,146 a	0,164 a
Média	2215	1361	0,77	0,47	0,237	0,408
CV (%)	36,5	34,9	45,0	41,1	40,8	23,4

Experimento 2020						
Tratamentos	Emissão acumulada		Intensidade de emissão		Fator de emissão	
	Total	Resíduo	Total	Resíduo	Total	Resíduo
	--- g N-N ₂ O ha ⁻¹ ---		-- g N-N ₂ O kg grãos ⁻¹ --		----- % -----	
SOLO	1980 b	555 b	-	-	-	-
CONTROLE	3424 a	1040 a	0,91 a	0,27 a	3,351 a	0,874 a
CPAC 7	2597 ab	553 b	0,70 ab	0,15 b	1,479 a	-0,027 a
CPAC 15	2810 ab	677 ab	0,69 ab	0,16 b	1,918 a	0,221 a
SEMIA 587	2272 b	637 ab	0,52 b	0,14 b	0,742 a	0,150 a
29 W	2383 ab	604 ab	0,55 b	0,14 b	1,001 a	0,018 a
Média	2578	678	0,674	0,172	1,698	0,247
CV (%)	32,8	23,0	15,8	30,2	115,6	23,1

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste T (LSD) a 5% de probabilidade.

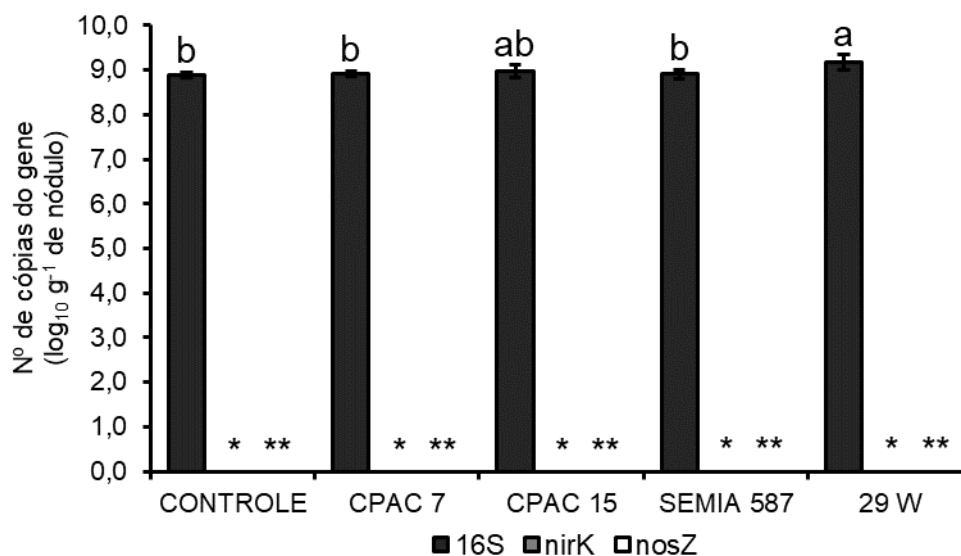


Figura 13. Número de cópias dos genes 16S, nirK e nosZ relacionadas com a desnitrificação presentes nos nódulos da soja cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. * representa a ausência do nirK, e ** representa a ausência do nosZ. 16S CV= 2,2%.

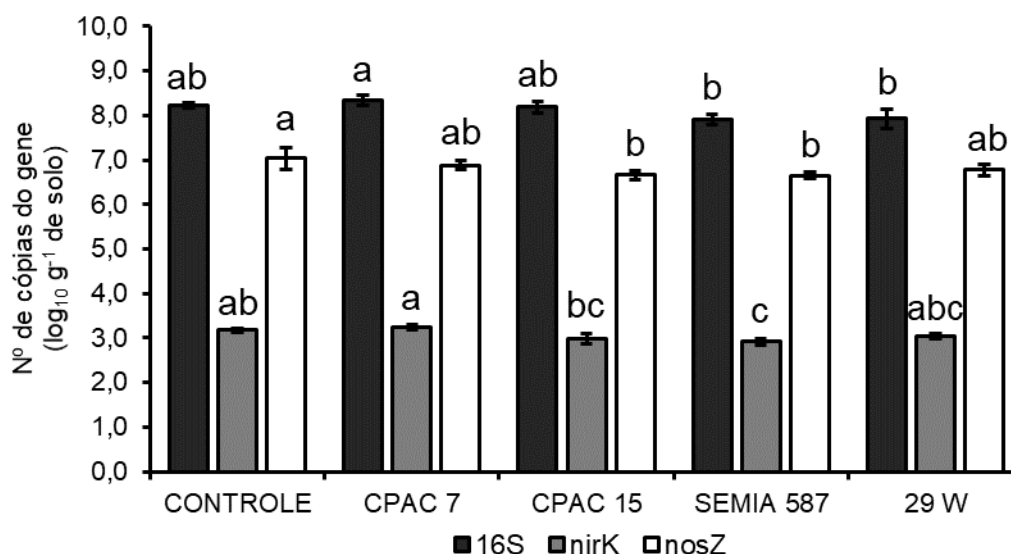


Figura 14. Número de cópias dos genes 16S, nirK e nosZ relacionadas com a desnitrificação presentes no solo cultivado com soja, cultivar M5917 no experimento 2020 inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 16S CV= 3,6%, nirK CV= 5,2%, e nosZ CV= 3,2%.

Para a intensidade de emissão, que indica a quantidade de N₂O emitida por kg de grãos produzidos, foram identificadas diferenças entre tratamentos, se destacando o Controle que esteve entre os tratamentos com maiores intensidades de emissão. No experimento 2017/2018 o Controle foi superior à inoculação com a SEMIA 587 para todo período avaliado (Total), e foi maior que a inoculação com CPAC 7, SEMIA 587 e 29 W se considerado o período a partir da deposição de resíduos (Resíduo), e os demais tratamentos não diferiram entre si.

No experimento 2020, o Controle apresentou maior intensidade de emissão total que os tratamentos com as estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e 29 W). Para o período que compreende as emissões de resíduos, a intensidade de emissão dos tratamentos inoculados se traduziu na capacidade de reduzir a intensidade de emissão de N₂O, o que de certa forma pode significar que a inoculação é uma medida de mitigação de emissões.

Ao avaliar o sistema de produção de soja no Mato Grosso, Raucci et al. (2015) observaram que a decomposição de resíduos da soja é a maior fonte de GEE, correspondendo a 36% de todos os GEE emitidos no sistema. A emissão de N₂O pela decomposição dos resíduos de soja são comparáveis com os efeitos de fertilizantes sintéticos (CHEN et al., 2013), sendo que as leguminosas contribuem nas emissões de N₂O com uma média global de 1,29 kg N-N₂O ha⁻¹ ano⁻¹ (JENSEN et al., 2012).

Não houve diferenças significativas para o fator de emissão (FE) no experimento 2017/2018. Os valores do FE calculados para o período total de monitoramento variaram entre 0,042 e 0,518%, e para o período iniciado com a deposição dos resíduos estiveram entre 0,164 e 0,702%, apesar da grande variação dos dados. As médias ficaram abaixo de 1,00 % (0,3±3%) indicados pelo IPCC para elaboração dos inventários de gases de efeito estufa (IPCC, 2006), exceto, no experimento 2020 em que o Controle apresentou elevado FE total (3,35%), porém sem efeitos significativos tanto para o FE total, quanto para o FE dos resíduos.

Ao revisar diversos trabalhos, Uchida e Akiyama (2013) calcularam FEs para a decomposição de resíduos da soja que variaram de 0 a 10%, com média de 1,3% ± 2,7%, e mediana de 0,2%, sendo o FE médio calculado para as emissões de N₂O ligeiramente superior ao padrão especificado nas diretrizes do IPCC. Porém, os FEs de N₂O da soja disponíveis na

literatura e utilizados nos cálculos utilizaram estimativas do N dos resíduos, obtidas por fórmula. Outro problema que se observa nessa meta-análise é a consideração de artigos que apresentam grande intervalo de tempo entre as coletas de N₂O, e avaliações restritas ao período de pós-colheita. Nosso estudo é o primeiro a quantificar todo o N dos resíduos da soja, inclusive folhas senescentes, raízes e nódulos, além de avaliar todo o ciclo da cultura e em pós-colheita, trazendo estimativas mais próximas da realidade.

Para melhorar as estimativas dos inventários de gases de efeito estufa seria necessário a determinação dos FEs em diferentes zonas climáticas de acordo com a cultura, manejo e tipo de solo, porém este ainda é um desafio devido ao grande volume de dados necessários (THOMSON et al., 2012). Outro desafio é prever a magnitude e fatores determinantes das emissões de N₂O após a adição de resíduos culturais ao solo (CHEN et al., 2013; RAUCCI et al., 2015).

Existem algumas estratégias para mitigar a emissão de N₂O em leguminosas, como o consórcio com não leguminosas, as quais podem absorver o N que é excretado pelas raízes das leguminosas (HAUGGAARD-NIELSEN; JENSEN, 2001), e a sucessão de culturas, que pode aproveitar o N proveniente dos resíduos culturais da leguminosa (GOMES et al., 2009). Mais recentemente, tem se estudado o uso de bactérias fixadoras de N com o aumento da atividade redutora de N₂O, expressado pelo gene *nosZ* como estratégia de mitigação (UCHIDA; AKIYAMA, 2013), um assunto que motivou o presente estudo.

5. CONCLUSÕES

O desempenho agronômico da cultura da soja foi positivamente influenciado independentemente da estirpe comercial utilizada, sendo quatro comerciais, registradas no MAPA, sendo elas a CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W.

Pelos resultados obtidos neste estudo, a inoculação da soja com a estirpe 29 W proporciona melhor desempenho agronômico, principalmente pelo fato de apresentar elevada fixação de N_2 e contribuir com balanço de N positivo para o solo.

A maior parte do N acumulado pela soja é exportado pelos grãos, e em condições ideais de cultivo as folhas senescentes são a principal via de retorno de N para o solo, seguido dos nódulos, resíduo da colheita e raízes.

Nas condições experimentais de campo não há efeito entre as estirpes na redução das emissões de N_2O , e o principal fator que contribui para o aumento das emissões no cultivo de soja é o preparo do solo e a decomposição dos resíduos no final do ciclo e pós-colheita.

O fator de emissão em geral nas condições edafoclimáticas do estudo são menores que o apresentado pelo IPCC, e o aumento da produtividade é um fator importante para aumentar a sustentabilidade do sistema de cultivo da soja por proporcionar menor quantidade de N_2O emitido por kg de grãos produzidos.

Em condições de ambiente controlado de casa de vegetação a CPAC 7 que possui todos os genes para uma desnitrificação completa e tem hidrogenase ativa reduz as emissões de N_2O da soja, e possui elevado desempenho agronômico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A soja cultivada no Brasil é considerada um sistema mitigador das emissões de N_2O devido ao amplo uso da inoculação com *Bradyrhizobium* spp. que garante um elevado desempenho da fixação biológica de nitrogênio fazendo dispensar a aplicação de fertilizantes nitrogenados. Este estudo mostrou que um balanço positivo de N para o solo pode ser alcançado com a cultura, especialmente pela inoculação da estirpe 29W (*B. elkanii*).

Este estudo demonstrou também que é possível mitigar ainda mais as emissões de N_2O pela decomposição de resíduos da cultura, desta vez pela inoculação da estirpe CPAC 7 (*B. diazoefficiens*) que é capaz de desnitrificar totalmente o NO_3^- até N_2 , estirpe conhecida por produzir baixa quantidade de H_2 (Hup⁺). O efeito mitigador foi verificado no experimento em condições controladas em casa de vegetação, porém em campo esse efeito não foi observado, possivelmente pela inoculação não ter sido eficiente para nodular a soja com as estirpes comerciais, dando espaço para estirpes pré-existentes no solo. Estudos para identificar se os nódulos foram colonizados pelas estirpes inoculadas se fazem necessários para confirmarmos esta hipótese.

Considerando a alta relevância socioeconômica da cultura soja no Brasil, e os impactos que o cultivo da soja gera nas emissões globais de N_2O , a determinação do fator de emissão foi uma contribuição importante para determinar os reais impactos do cultivo de soja no Brasil servindo de subsídio para a elaboração dos inventários nacionais de gases de efeito estufa. Porém, mais estudos são necessários para determinação do fator de emissão de N_2O que abranja regiões produtoras de soja.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, H.; HOSHINO, Y.T.; ITAKURA, M.; SHIMOMURA, Y.; WANG, Y.; YAMAMOTO, A.; TAGO, K.; NAKAJIMA, Y.; MINAMISAWA, K.; HAYATSU, M. Mitigation of soil N₂O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **Scientific Reports**, v. 6, 32869. DOI: 10.1038/srep32869
- AL-FALIH, A.M.K. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by Rhizobium. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 1277-1293, 2002. DOI: 10.3923/pjbs.2002.1277.1293
- ALMARAZ, J.J.; ZHOU, X.; MABOOD, F.; MADRAMOOTOO, C.; ROCHETTE, P.; MAE, B.L.; SMITH, D.L. Greenhouse gas fluxes associated with soybean production under two tillage systems in southwestern Quebec. **Soil & Tillage Research**, v. 104, p. 134-139, 2009. DOI: 10.1016/j.still.2009.02.003
- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of FBN in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1-9, 2003. DOI: 10.1023/A:1024191913296
- ALVES, B.J.R.; JANTALIA, C.P.; MADARI, B.E.; MACHADO, P.L.O.A.; FRANCHINI, J.C.; SANTOS, H.P.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Emissões de óxido nitroso de solos pelo uso de fertilizantes nitrogenados em áreas agrícolas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 1-6, 2010. (Comunicado Técnico, 126).
- ALVES, B.J.R.; SMITH, K.A.; FLORES, R.A.; CARDOSO, A.S.; OLIVEIRA, W.R.D.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of the most suitable sampling time for static chambers for the estimation of daily mean N₂O flux from soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 129-135, 2012. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.11.022
- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de N em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 449-456, 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006000300011
- AMBROSINI, V.G.; FONTOURA, S.M.; DE MORAES, R.P.; TAMAGNO, S.; CIAMPITTI, I.A.; BAYER, C. Soybean yield response to *Bradyrhizobium* strains in fields with inoculation history in Southern Brazil. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, p. 1941-1951, 2019. DOI: 10.1080/01904167.2019.1648680
- ARAÚJO, K.E.C.; VERGARA, C.; GUIMARÃES, A.P.; ROUWS, J.R.C.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Changes in ¹⁵N natural abundance of biologically fixed N₂ in soybean due to shading, rhizobium strain and plant growth stage. **Plant Soil**, v. 426, p. 413-428, 2018. DOI: 10.1007/s11104-018-3627-4
- ARNOLD, S.; SCHEPERS, J. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, p. 537-545, 2004. DOI: 10.1081/CSS-120029730

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília. p. 212, 2003.

BAGGS, E.M.; REES, R.M.; SMITH, K.A.; VINTEN, A.J.A. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. **Soil Use and Management**, v. 16, n. 2, p. 82-87, 2000. DOI: 10.1111/j.1475-2743.2000.tb00179.x

BAGGS, E.M.; REES, R.M.; SMITH, K.A.; VINTEN, A.J.A. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. **Soil Use and Management**, v. 16, p. 82-87, 2000. DOI: 10.1111/j.1475-2743.2000.tb00179.x

BAGINSKY, C.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; PALACIOS, J.M.; RUIZ-ARGUESO, T. Diversity and evolution of hydrogenase systems in rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4915-4924, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.10.4915-4924.2002

BARTHELEMY-DELAUX, C.; MARBURGER, D.; DELAUX, P.M.; CONLEY, S.; ANÉ, J.M. Effect of drought on *Bradyrhizobium japonicum* populations in Midwest soils. **Plant and Soil**, v. 382, p. 165-173, 2014. DOI: 10.1007/s11104-014-2155-0

BEDMAR, E.J.; BUENO, E.; CORREA, D.; TORRES, M.J.; DELGADO, M.J.; MESA, S. Ecology of denitrification in soils and plant-associated bacteria. In: RODELAS GONZÁLEZ, B.; GONZALEZ-LÓPEZ, J. (Eds.) **Beneficial plantmicrobial interactions: Ecology and Applications**. CRC Press, Boca Ratón: Florida, 2013, p. 164-182.

BEDMAR, E.J.; ROBLES, E.F.; DELGADO, M.J. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 141-144, 2005. DOI: 10.1042/BST0330141

BERRY, E.A.; GUERGOVA-KURAS, M.; HUANG, L.S.; CROFTS, A.R. Structure and function of cytochrome bc complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 1005-1075, 2000. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.1005

BERTERO, M.G.; ROTHERY, R.A.; PALAK, M.; HOU, C.; LIM, D.; BLASCO, F.; WEINER, J.H.; STRYNADKA, N.C.J. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, p. 681-687, 2003. DOI: 10.1038/nsb969

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 407-415, 1997. DOI: 10.1007/s003740050333

BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P.J. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 57, p. 235-270, 2000. DOI: 10.1023/A:1009890514844

BOGINO, P.; BANCHIO, E.; BONFIGLIO, C.; GIORDANO, W. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. Strain in Soils Containing Indigenous Rhizobia. **Current Microbiology**, v. 56, p. 66-72, 2008. DOI: 10.1007/s00284-007-9041-4

BONATO, E.R.; BERTAGNOLLI, P.F.; LANGE, C.E.; RUBIN, S. de A.L. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2391-2398, 2000. DOI: 10.1590/S0100-204X2000001200009

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura: plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério do Desenvolvimento Agrário, coordenação da Casa Civil da Presidência da República. – Brasília: MAPA/ACS. 173 p. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/planoabc/arquivo-publicacoes-plano-abc/download.pdf>. Acessado em 14 de set. de 2020.

BUENO, E.; RICHARDSON, D. J.; BEDMAR, E. J.; DELGADO, M. J. Expression of *Bradyrhizobium japonicum* cbb3 terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, p. 20-28, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01711.x

BUENO, E.; MESA, S.; BEDMAR, E. J.; RICHARDSON, D. J.; DELGADO, M. J. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, p. 819-852, 2012. DOI: 10.1089/ars.2011.4051

BUENO, E.; ROBLES, E. F.; TORRES, M. J.; KRELL, T.; BEDMAR, E.J.; DELGADO, M.J.; MESA, S. Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC, nirK and norCBQD denitrification genes. **Nitric Oxide**, v. 68, p. 137-149, 2017. DOI: 10.1016/j.niox.2017.02.002

BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Biological nitrogen fixation. **Annual Review of Nutrition**, v. 13, p. 317-335, 1993. DOI: 10.1146/annurev.nu.13.070193.001533

CABELLO, P.; ROLDAN, M.D.; MORENO-VIVIAN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology**, v. 150, p. 3527-3546, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.27303-0

CAMPOS, D.V.B.; LIMA, E.; ZONTA, E.; BALIEIRO, F. C.; GUERRA, J. G. M.; POLIDORO, J.C.; ANJOS, L. H. C.; FREIRE, L. R.; LEAL, M. A. A.; PEREIRA, M.G.; FERREIRA, M. B. C. Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. Brasília: Embrapa; Seropédica, RJ: Universidade Rural, 2013, 430 p.

CASELLA, S.; SHAPLEIGH, J.P.; PAYNE, W.J. Nitrite reduction in Bacteroids of *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT 1. **Archives of Microbiology**, v. 149, p. 384-388, 1988. DOI: 10.1007/BF00425575

CASTRESANA, J.; SARASTE, M. Evolution of energetic metabolism: the respirationearly hypothesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, p. 443-448, 1995. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)89098-2

CATTELAN, A.J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 25, 2018. DOI: 10.1051/ocl/2017058

CHEN, H. H.; LI, X. C.; HU, F.; SHI, W. Soil nitrous oxide emissions following crop residue addition: a meta-analysis. **Global Change Biology**, 19, 2956e2964, 2013. DOI: 10.1111/gcb.12274

CHEN, J.; STROUS, M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1827, p. 136-144, 2013. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.10.002

CHERKASOV, N.; IBHADON, A.O.; FITZPATRICK P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **Chemical Engineering and Processing**, v. 90, p. 24-33, 2015. DOI: 10.1016/j.cep.2015.02.004

CHIBEBA, A.M.; KYEI-BOAHENC, S.; GUIMARÃES, M. F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 246, p. 291-305, 2017. DOI:10.1016/j.agee.2017.06.017

CIAIS, P.; SABINE, C.; BALA, G.; BOPP, L.; BROVKIN, V.; CANADELL, J.; CHHABRA, A.; DEFRIES, R.; GALLOWAY, J.; HEIMANN, M. Carbon and other biogeochemical cycles. Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. 2014.

CIAMPITTI, I. A.; CIARLO, E. A.; CONTI, M. E. Nitrous oxide emissions from soil during soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crop phenological stages and stubbles decomposition period. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 581-588, 2008. DOI: 10.1007/s00374-007-0241-7

COELHO, C.; GONZALEZ, P. J.; MOURA, J. J. G.; MOURA, I.; TRINCAO, J.; ROMAO, M. J. The crystal structure of cupriavidus necator nitrate reductase in oxidized and partially reduced states. **Journal of Molecular Biology**, v. 408, p. 932-948, 2011. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.03.016

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 8 - Safra 2020/2021, n. 12 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-98, setembro 2021.

CONRAD, R.; SEILER, W. The role of H_2 bacteria during the decomposition of H_2 by soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 6, p. 143-145, 1979. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1979.tb04296.x

COOPER, J.E.; SCHERER, H.W. Chapter 16 – nitrogen fixation. In: Marschner P (ed) Marschner's Mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic, San Diego, p. 389-408, 2012.

COSENTINO, V.R.N.; BRUTTI, L.N.; CIVEIRA, G.; TABOADA, M.Á. Aporte de la Fijación Biológica de Nitrógeno a la Emisión de N_2O desde el Suelo con Cultivo de Soja, **Ciencia del Suelo**, v. 33, n. 2, p. 313-321, 2015.

CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 102, p. 279-297, 2004. DOI: 10.1016/j.agee.2003.09.018

DE KLEIN, C.A.M.; LUO, J.; WOODWARD, K.B.; STYLES, T.; WISE, B.; LINDSEY, S.; COX, N. The effect of nitrogen concentration in synthetic cattle urine on nitrous oxide emissions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 188, p. 85-92, 2014. DOI: 10.1016/j.agee.2014.02.020

DELAMUTA, J. R. R.; RIBEIRO R.A.; ORMEÑO-ORRILHO, E.; MELO, I.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group I strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342-3351, 2013. DOI: 10.1099/ijs.0.049130-0

DELGADO, M.J.; CASELLA, S.; BEDMAR, E.J. Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S.J.; NEWTON, W.E. (Eds.) **Biology of the Nitrogen Cycle**. Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 3-20.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**, v. 2, p. 621-631, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro954

DONG, Z.; LAYZELL, D.B. H₂ oxidation, O₂ uptake and CO₂ fixation in hydrogen treated soils. **Plant Soil**, v. 229, p. 1-12, 2001. DOI: 10.1023/A:1004810017490

DONG, Z.; WU, L.; KETTLEWELL, B.; CALDWELL, C.D.; LAYZELL, D.B. Hydrogen fertilization of soils - Is this a benefit of legumes in rotation?. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 1875-1879, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.01103.x

DOWNIE, J.A. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. **Current Biology**, v. 15, p. 196-198, 2005. DOI: 10.1016/j.cub.2005.03.007

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12 p. 13-15, 1990.

DUCLUZEAU, A.-L.; VAN LIS, R.; DUVAL, S.; SCHOEPP-COTHENET, B.; RUSSELL, M.J.; NITSCHKE, W. Was nitric oxide the first deep electron sink?. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, p. 9-15, 2009. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.10.005

EFREMOV, R.G.; BARADARAN, R.; SAZANOV, L.A. The architecture of respiratory complex I, **Nature**, v. 465, p. 441-445, 2010. DOI: 10.1038/nature09066

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solos. 2^a ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997, 212p.

ETTWIG, K.F.; BUTLER, M.K.; LE PASLIE, D.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S.; KUYPERS, M.M.M.; SCHREIBER, F.; DUTILH, B.E.; ZEDELIOUS, J.; DE BEER, D.; GLOERICH, J.; WESSELS, H.J.C.T.; VAN ALLEN, T.; LUESKEN, F.; WU, M.L.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; DEN CAMP, H.J.M.O.; JANSSEN-MEGENS, E.M.; FRANCOIS, K.-J.; STUNNENBERG, H.; WEISSENBAACH, J.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. Nitrite-

driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria, **Nature**, v. 464, p. 543-548, 2010. DOI: 10.1038/nature08883

EVANS, H.J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, A.S.; HANUS, F.J. The present status of hydrogen recycling in legumes. **Israel Journal of Botany**, v. 31, p. 72-88, 1982. DOI: 10.1080/0021213X.1982.10676931

FERNÁNDEZ, L.A.; PEROTTI, E.B.; SAGARDOY, M.A.; GÓMEZ, M.A. Denitrification activity of *Bradyrhizobium* sp. Isolated from Argentine soybean cultivated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2577-2585, 2008. DOI: 10.1007/s11274-008-9828-x?shared-article-renderer

FIELD S.J.; ROLDAN, M.D.; MARRITT, S.J.; BUTT, J.N.; RICHARDSON, D.J.; WATMOUGH, N.J. Electron transfer to the active site of the bacterial nitric oxide reductase is controlled by ligand binding to heme b3, **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, v. 1807, p. 451-457, 2011. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.01.009

FLOCK, U.; LACHMANN, P.; REIMANN, J.; WATMOUGH, N.J.; ADELROTH, P. Exploring the terminal region of the proton pathway in the bacterial nitric oxide reductase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 845-850, 2009. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.02.008

FLYNN, B.; GRAHAM, A.; SCOTT, N.; LAYZELL, D.B.; DONG, Z. Nitrogen fixation, hydrogen production and N₂O emissions. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, p. 1037-1041, 2014. DOI: 10.4141/cjps2013-210

FORSTER, P.; RAMASWAMY, V.; ARTAXO, P.; BERNTSEN, T.; BETTS, R.; FAHEY, D.W.; HAYWOOD, J.; LEAN, J.; LOWE, D.C.; MYHRE, G.; NGANGA, J.; PRINN, R.; RAGA, G.; SCHULZ, M.; VAN DORLAND, R. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (Eds.). SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007, p. 131-217.

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M.A.; CAPE, J.N.; REIS, S.; SHEPPARD, L.J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J.N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A.F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the 21st century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, 2013. DOI: 10.1098/rstb.2013.0164

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

FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J.A.A. A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculante no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, p. 1-25, 1999.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated

from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.5336–5342, 2003. DOI: 10.1128/aem.69.9.5336-5342.2003

GAO, Y.; MANIA, D.; MOUSAVI, S.A.; LYCUS, P.; ARNTZEN, M.Ø.; WOLIY, K.; LINDSTRÖM, K.; SHAPLEIGH, J.P.; BAKKEN, L.R.; FROSTEGÅRD, Å. Competition for electrons favours N₂O reduction in denitrifying *Bradyrhizobium* isolates. **Environmental Microbiology**, v. 0, p.00-00, 2021. DOI: 10.1111/1462-2920.15404

GARCIA-PLAZAOLA, J.I.; BECERRIL, J.M.; ARRESE-IGOR, C.; HERNANDEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; APARICIO-TEJO, P.M. Denitrifying ability of thirteen *Rhizobium meliloti* strains. **Plant and Soil**, v. 149, p. 43-50, 1993. DOI: 10.1007/BF00010761

GIAMBALVO, D.; AMATO, G.; BADAGLIACCA, G.; INGRAFFIA, R.; MICELI, G.D.; FRENDIA, A.S.; PLAIA, A.; VENEZIA, G.; RUISI, P. Switching from conventional tillage to no-tillage: Soil N availability, N uptake, ¹⁵N fertilizer recovery, and grain yield of durum wheat. **Field Crops Research**, v. 218, p. 171-181, 2018.

GOMES, J.; BAYER, C.; COSTA, F.S.; PICCOLO, M.C.; ZANATTA, J.A.; VIEIRA, F.C.B.; SIX, J. Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. **Soil & Tillage Research**, v. 106, p. 36-44, 2009. DOI: 10.1016/j.still.2009.10.001

GONÇALVES, G.K.; SOUSA, R.O.; VAHL, L.C.; BORTOLON, L. Solubilização dos fosfatos naturais Patos de Minas e Arad em dois solos alagados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2157-2164, 2008. DOI: 10.1590/S0100-06832008000500036

GRAHAM, A.; LAYZELL, D.B.; SCOTT, N.A.; CEN, Y.; KYSER, T.K. Carbon sequestration in soybean crop soils: the role of hydrogen-coupled CO₂ fixation. **American Geophysical Union**, Fall Meeting, Abstract No. B11A-0466, 2011.

GREEN, S.J.; PRAKASH, O.; GIHRING, T.M.; AKOB, D.M.; JASROTIA, P.; JARDINE, P.M.; WATSON, D.B.; BROWN, S.D.; PALUMBO, A.V.; KOSTKA, J.E. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3244-3254, 2010. DOI: 10.1128/AEM.03069-09

GRÖNEMEYER, J.L.; KULKARNI, A.; BERKELMANN, D.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Identification and characterization of rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 7244-7257, 2014. DOI: 10.1128/AEM.02417-14

GUIMARÃES, A.P.; MORAIS, R.F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. *Bradyrhizobium* strain and the ¹⁵N natural abundance quantification of biological N₂ fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 516-524, 2008. DOI: 10.1590/S0103-90162008000500011

HALLIN, S.; LINDGREN, P.E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1652-1657, 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999

HAUGGAARD-NIELSEN, H.; JENSEN, E.S. Evaluating pea and barley cultivars for complementarity in intercropping at different levels of soil N availability. **Field Crops Research**, 72:185-196, 2001. DOI: 10.1016/S0378-4290(01)00176-9

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 33-45, 2008. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x

HÉNAULT, C.; REVELLIN, C. Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. **Plant and Soil**, v. 346, p. 289-296, 2011. DOI: 10.1007/s11104-011-0820-0

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008. DOI: 10.1007/s11104-008-9668-3

HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; WITTEBOLLE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DEVOS, P. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. **Applied and Environment Microbiology**, v. 72, p. 2637-2643, 2006. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2637-2643.2006

HINO, T.; NAGANO, S.; SUGIMOTO, H.; TOSHA, T.; SHIRO, Y. Molecular structure and function of bacterial nitric oxide reductase. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, v. 1817, p. 680-687, 2012. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.09.021

HIRAYAMA, J.; EDA, S.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Nitrate dependent N₂O emission from intact soybean nodules via denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 8787-8790, 2011. DOI: 10.1128/AEM.06262-11

HOBBIE, E.A.; OUIMETTE, A.P. Controls of nitrogen isotope patterns in soil profiles. **Biogeochemistry**, v. 95, p. 355-371, 2009. DOI: 10.1007/s10533-009-9328-6

HOFFMAN, B.M.; LUKOYANOV, D.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L.C. Nitrogenase: a draft mechanism. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, p. 587-595, 2013. DOI: 10.1021/ar300267m

HÖGBERG, P. Tansley Review ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v. 137, p. 179-203, 1997. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x

HUANG, Y.; ZOU, J.; ZHENG, X.; WANG, Y.; XU, X. Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 973-981, 2004. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.02.009

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994, p. 9-89.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; GALERANI, P.R. **Adubação nitrogenada na soja?**. Londrina: Embrapa Soja, p. 1-4, 1997. (Comunicado Técnico, 57).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; FERREIRA, M.C.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.; FAQUIN, V.; FURTINNI, A.E.; CARVALHO, J.G. (Eds.). **Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Universidade Federal de Lavras, 1999, p. 597-620.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001, p. 48. (Circular Técnica, 35).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Eds.) **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Springer, Netherlands, p. 25-42, 2005a.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.; MENDES, I.; CAMPO, R.; GRAHAM, P. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Eds) **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Springer, Netherlands, p. 223-253, 2005b.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939, 2006. DOI: 10.4141/P05-098

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. (2007) A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007, p. 80.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., v. 2, 2015, p. 1009-1024.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S.; JÚNIOR, S.; BARBOSA, E.; ZILLI, J.E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, p. 1106-1112, 2017. DOI: 10.2134/agronj2016.11.0641

HUNTE, C.; ZICKERMANN, V.; BRANDT, U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. **Science**, v. 329, p. 448-451, 2010. DOI: 10.1126/science.1191046

HUSSAIN, S.K.; MIELKE, L.N.; SKOPP, J. Detachment of soil as affected by fertility management and crop rotations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, p. 1462-1468, 1988. DOI: 10.2136/sssaj1988.03615995005200050049x

IGARASHI, R.Y.; SEEFELDT, L.C. Nitrogen fixation: the mechanism of the Modependent nitrogenase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 2, p. 351-384, 2003. DOI: 10.1080/10409230391036766

INABA, S.; TANABE, K.; EDA, S.; IKEDA, S.; HIGASHITANI, A.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Nitrous oxide emission and microbial community in the rhizosphere of nodulated soybeans during the late growth period. **Microbes and Environments**, v. 24, p. 64-67, 2009. DOI: 10.1264/jsme2.ME08544

INABA, S.; IKENISHI, F.; ITAKURA, M.; KIKUCHI, M.; EDA, S.; CHIBA, N.; KATSUYAMA, C.; SUWA, Y.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. N₂O Emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. **Microbes and Environments**, v. 27, p. 470-476, 2012. DOI: 10.1264/jsme2.ME12100

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (1997): Greenhouse gas reference manual: revised 1996 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Reference v. 3. (Eds.) HOUGHTON, J.T.; MEIRA FILHO, L.G.; LIM, B.; TRÉANTON, K.; MAMATY, I.; BONDUKY, Y.; GRIGGS, D.J.; CALLANDER, B.A. IPCC/OECD/IEA, Paris, France. Disponível em: <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gl/invs6c.htm>. Acessado em 10 de ago. de 2020.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (2006). Guideline for National Greenhouse Inventories. Paris: IPCC/OECD/IEA. Disponível em: <https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>. Acessado em 05 de jun. de 2020.

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

ITAKURA, M.; TABATA, K.; EDA, S.; MITSUI, H.; MURAKAMI, K.; YASUDA, J.; MINAMISAWA, K. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated dnaQ gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7258-7264, 2008. DOI: 10.1128/aem.01850-08

ITAKURA, M.; TABATA, K.; EDA, S.; MITSUI, H.; MURAKAMI, K.; YASUDA, J.; MINAMISAWA, K. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated dnaQ gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7258-7264, 2008. DOI: 10.1128/AEM.01850-08.

IWATA, S.; OSTERMEIER, C.; LUDWIG, B.; MICHEL, H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. **Nature**, v. 376, p. 660-669, 1995. DOI: 10.1038/376660a0

JANTALIA, C.P.; HALVORSON, A.D.; FOLLETT, R. F.; ALVES, B. J. R.; POLIDORO, J.C.; URQUIAGA, S. Nitrogen source effects on ammonia volatilization as measured with semi-static chambers. **Agronomy Journal**, v. 104, p. 1595-1603, 2012. DOI: 10.2134/agronj2012.0210

JATON, K.; NINET, B.; BILLE, J.; GREUB, G. False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4590-4591, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01766-10

JIANG, H.; EGLI, D.B. Shade induced changes in flower and pod number and flower and fruit abscission in soybean. **Agronomy Journal**, v. 85, n. 2, p. 221-225, 1993. DOI: 10.2134/agronj1993.00021962008500020011x

JENSEN, E.S.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M.; GRESSHOFF, P.M.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; ALVES, B.J.R.; MORRISON, M.J. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 329-364, 2012. DOI: 10.1007/s13593-011-0056-7

JONES, C.M.; STRES, B.; ROSENQUIST, M.; HALLIN, S. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1955-1966, 2008. DOI: 10.1093/molbev/msn146

KATO, K.; KANAHAMA, K.; KANAYAMA, Y. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 238-241, 2010. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.08.006

KAVADIA, A.; OMIROU, M.; FASOULA, D.; IOANNIDES, I.M. The Importance of Microbial Inoculants in a Climate-Changing Agriculture in Eastern Mediterranean Region. Review. **Atmosphere**, v. 11, p. 1136, 2020. DOI:10.3390/atmos11101136

KAYE, N.M.; MASON, S.C.; GALUSHA, T.D.; MAMO, M. Nodulating and non-nodulating soybean rotation influence on soil nitrate-nitrogen and water, and sorghum yield. **Agronomy Journal**, 99:599-606, 2007. DOI: 10.2134/agronj2005.0290

KERN, M.; SIMON, J. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 6, p. 646-56, 2009. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2008.12.010

KHALIL, M.I.; BAGGS, E.M. CH₄ oxidation and N₂O emissions at varied soil waterfilled pore spaces and headspace CH₄ concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1785-1794, 2005. DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.02.012

KIEHL, E.J. Manual de Edafologia: Relações Solo-Planta. **Ceres**, São Paulo, 1979.

KIM, Y.; NAKAYAMA, N.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, M.; SHIMADA, S.; ARIHARA, J. NO and N₂O emissions from fields in the diferente nodulated genotypes of soybean (in Japanese). **Japanese Journal of Crop Science**, v. 74, p. 427-430, 2005. DOI: 10.1626/jcs.74.427

KLOOS, K.; MERGEL, A.; RÖSCH, C.; BOTHE, H. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. **Functional Plant Biology**, v. 28, p. 991-998, 2001. DOI: 10.1071/PP01071

KONDOROSI, E.; MERGAERT, P.; KERESZT, A. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of rhizobium Bacteria provoked by host plant factors. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 611-628, 2013. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155630

KOUTNY M.; KUCERA, I.; TESARIK, R.; TURANEK, J.; VAN SPANNING, R. J. M. Pseudoazurin mediates periplasmic electron flow in a mutant strain of *Paracoccus denitrificans* lacking cytochrome c550. **FEBS Letters**, v. 448, p. 157-159, 1999. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00345-2

KRAFTA, B.; STROUSA, M.; TEGETMEYERA, H.E. Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, v. 155, p. 104-117, 2011. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.025

KUANG, W.; GAO, X.; TENUTA, M.; GUI, D.; ZENG, F. Relationship between soil profile accumulation and surface emission of N₂O: effects of soil moisture and fertilizer nitrogen. **Biology and Fertility of Soils**, v. 55, p. 97-107, 2019. DOI: 10.1007/s00374-018-01337-4

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing (1991). In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (eds.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Vol. 72, p. 115-148. Qpcr Tracks Multiple Dehalococcoides Strains 2773. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. 2006.

LA FAVRE, J. S.; FOCHT, D. D. Conservation in soil of H₂ liberated from N₂ fixation by Hup⁻ nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 304-311, 1983. DOI: 10.1128/AEM.46.2.304-311.1983

LI, X.; HUA, F.; SHIB, W. Plant material addition affects soil nitrous oxide production differently between aerobic and oxygen-limited conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 91-98, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.10.003

LIU, B.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, C.; JIN, J.; HERBERT, S. J. L. Lower total soluble sugars in vegetative parts of soybean plants are responsible for reduced pod number under shading conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 1852-1857, 2011.

LIU, F.; JENSEN, C. R.; ANDERSEN, M.N. Pod Set Related to Photosynthetic Rate and Endogenous ABA in Soybeans Subjected to Different Water Regimes and Exogenous ABA and BA at Early Reproductive Stages. **Annals of Botany**, v. 94, p. 405-411, 2004. DOI: 10.1093/aob/mch157

LIU, S. W.; QIN, Y. M.; ZOU, J. W.; LIU, Q. H. Effects of water regime during rice-growing season on annual direct N₂O emission in a paddy ricewinter wheat rotation system in Southeast China. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 906-913, 2010. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.002

LIU, R.; HAYDEN, H. L.; SUTER, H.; HU, H. W.; LAM, S. K.; HE, J.Z.; MELE, P. M.; CHEN, D.L. The effect of temperature and moisture on the source of N₂O and contributions from ammonia oxidizers in an agricultural soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, p. 141-152, 2017. DOI: 10.1007/s00374-016-1167-8

LUCINSKI, R.; POLCYN, W.; RATAJCZAK, L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, p. 537-546, 2002. DOI: 10.18388/abp.2002_3813

MACHADO, P. V. F.; FARRELL, R. E.; BELL, G.; TAVEIRA, C. J.; CONGREVES, K. A.; VORONEY, R. P.; DEEN, W., WAGNER-RIDDLE, C. Crop residues contribute minimally to spring-thaw nitrous oxide emissions under contrasting tillage and crop rotations. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 152 (online first), 2021. DOI: 10.1016/j.soilbio.2020.108057

MANIA, D.; WOLIY, K.; DEGEFU, T.; FROSTEGÅRD, Å. A common mechanism for efficient N₂O reduction in diverse isolates of nodule-forming bradyrhizobia. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 17-31, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.14731

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf. Acessado em 20 de jul. de 2020.

MATHIEU, C.; MOREAU, S.; FREND, P.; PUPPO, A.; DAVIES, M.J. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 1242-1249, 1998. DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00440-1

MINCHIN, F. R.; JAMES, E. K.; BECANA, M. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. (Eds.) **Nitrogen-fixing Leguminous Symbiosis**. Berlin: Springer Science, 2008, p. 321-362.

MITCHELL, P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c₁ complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. **FEBS Letters**, v. 56, p. 1-6, 1975. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80098-6

MOIR, J. W. B.; BARATTA, D.; RICHARDSON, D. J.; FERGUSON, S. J. The purification of a cd1-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*; the role of pseudoazurin as an electron donor. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, p. 377-385, 1993. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17672.x

MOIR, J. W. B.; WOOD, N. J. Nitrate and nitrite transport in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 215-224, 2001. DOI: 10.1007/PL00000849

NAJMUDIN, S.; GONZALEZ, P. J.; TRINCAO, J.; COELHO, C.; MUKHOPADHYAY, A.; CERQUEIRA, N. M. F. S. A.; ROMAO, C. C.; MOURA, I.; MOURA, J. J. G.; BRONDINO, C.D.; ROMAO, M.J. Periplasmic nitrate reductase revisited: a sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 737-753, 2008. DOI: 10.1007/s00775-008-0359-6

NASCIMENTO, E. C. **Potencial desnitrificador de estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a cultura da soja**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

NEVES, M. C.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 1179-1192, 1985. DOI: 10.1093/jxb/36.8.1179

- OBANDO, M.; CORREA-GALEOTE, D.; CASTELLANO-HINOJOSA, A.; GUALPA, J.; HIDALGO, A.; ALCH, J. D.; BEDMAR, E.; CASSAN, F. Analysis of the denitrification pathway and greenhouse gases emissions in *Bradyrhizobium* sp. strains used as biofertilizers in South America. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 739-749, 2019. DOI: 10.1111/jam.14233
- OHYAMA, T.; FUJIKAKE, H.; YASHIMA, H.; TANABATA, S.; ISHIKAWA, S.; SATO, T.; NISHIWAKI, T.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; ISHII, S.; FUJIMAKI, S. Effect of Nitrate on Nodule Formation and Nitrogen Fixation of Soybean, Edited by Hany El-Shemy, **Soybean Physiology and Biochemistry**, 2011. DOI: 10.5772/17992
- OKITO, A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1179-1190, 2004. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.03.004
- OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519-546, 2008. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- PAJARES, S.; BOHANNAN, B.J. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01045
- PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A. P.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.M. ¹⁵N natural abundance of biologically fixed N₂ in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 1694-1700, 2010. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.05.032
- PHILIPPOT, L.; ANDERT, J.; JONES, C.M.; BRU, D.; HALLIN, S. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. **Global Change Biology**, v. 17, p. 1497-1504, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x
- POMOWSKI, A.; ZUMFT, W. G.; KRONECK, P. M. H.; EINSLE, O. N₂O binding at a 4Cu:2S copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase. **Nature**, v. 477, p. 234-237, 2011. DOI: 10.1038/nature10332
- PONNAMPERUMA, F. N. Advances in Agronomy. v. 24, p. 29-96, 1972. DOI: 10.1016/S0065-2113(08)60633-1
- POPELIER, F.; LEISSENS, J.; VERSTRAETE, W. Soil hydrogen uptake in relation to soil properties and rhizobial hydrogen production. **Plant and Soil**, v. 85, p. 85-96, 1985. DOI: 10.1007/BF02197803
- PREISIG, O.; ANTHAMATTAN, D.; HENNECKE, H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3309-3313, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.8.3309

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 291-303, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.171

PUPPO, A.; GROTEN, K.; BASTIAN, F.; CARZANIGA, R.; SOUSSI, M.; MERCEDES LUCAS, M.; FELIPE, M. R.; HARRISON, J.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process, **New Phytologist**, v. 165, n. 3, p. 683-701, 2005. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x

QIN, H.; XING, X.; TANG, Y.; ZHU, B.; WEI, X.; CHEN, X.; LIU, Y. Soil moisture and activity of nitrite- and nitrous oxide-reducing microbes enhanced nitrous oxide emissions in fallow paddy soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 53-67, 2020. DOI: 10.1007/s00374-019-01403-5

QIN, H.; WANG, D.; XING, X.; TANG, Y.; WEI, X.; CHEN, X.; ZHANG, W.; CHEN, A.; LI, L.; LIU, Y.; ZHU, B. A few key *nirK*- and *nosZ*-denitrifier taxa play a dominant role in moisture-enhanced N₂O emissions in acidic paddy soil. **Geoderma**, v. 385, 2021. DOI: 10.1016/j.geoderma.2020.114917

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acessado em 15 de jun. de 2020.

RAUCCI, G. S.; MOREIRA, C. S.; ALVES, P. A.; MELLO, F. F. C.; FRAZÃO, L. A.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C. Greenhouse gas assessment of Brazilian soybean production: a case study of Mato Grosso State. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 418-425, 2015. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.02.064

RICHARDSON D. J. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment, **Microbiology-UK**, v. 146, p. 551-571, 2000. DOI: 10.1099/00221287-146-3-551

RICHARDSON D. J.; BERKS B. C.; RUSSELL D. A.; SPIRO S.; TAYLOR C. J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 165-178, 2001. DOI: 10.1007/PL00000845

RICHARDSON, D.; FELGATE, H.; WATMOUGH, N.; THOMSON, A.; BAGGS, E. Mitigating release of the potente greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle – could enzymic regulation hold the key?. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 388-397, 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.03.009

RISGAARD-PETERSEN, N.; LANGEZAAL, A.M.; INGVARDBSEN, S.; SCHMID, M. C.; JETTEN, M. S. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; DERKSEN, J. W. M.; PINA-OCHOA, E.; ERIKSSON, S. P.; PETER NIELSEN, L.; PETER REVSBECH, N.; CEDHAGEN, T.; VAN DER ZWAAN, G. J. Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. **Nature**, v. 443, p. 93-96, 2006. DOI: 10.1038/nature05070

RITALAHTI, K. M.; AMOS, B. K.; SUNG Y.; WU, Q.; KOENIGSBERG, S. S.; LÖFFLER, F. E. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously

monitors multiple Dehalococcoides strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2765–2774, 2006. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2765-2774.2006

ROCHESTER, I. J.; PEOPLE, M. B.; CONSTABLE, G.A.; GAULT, R. R. Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 38, p. 253-260, 1998. DOI: 10.1071/EA97132

ROCHETTE, P.; ANGERS, D. A.; BELANGER, G.; CHANTIGNY, M. H.; PREVOST, D.; LEVESQUE, G. Emissions of N₂O from alfalfa and soybean crops in eastern Canada. **Soil Science Society of America Journal**, v. 68, p. 93-506, 2004. DOI: 10.2136/sssaj2004.0493

ROCHETTE, P.; JANZEN, H.H. Towards a revised coefficient for estimating N₂O emissions from legumes. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 73, p. 171-179, 2005. DOI: 10.1007/s10705-005-0357-9

RUSER, R.; SCHULZ, R. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils-A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, p. 171-188. 2015. DOI: 10.1002/jpln.201400251

SAEKI, Y.; NAKAMURA, M.; MASON, M. L. T.; YANO, T.; SHIRO, S.; SAMESHIMA-SAITO, R.; ITAKURA M.; MINAMISAWA, K.; YAMAMOTO, A. Effect of Flooding and the nosZ Gene in Bradyrhizobia on Bradyrhizobial Community Structure in the Soil. **Microbes and Environments**, v. 32, p. 154-163, 2017. DOI: 10.1264/jsme2.ME16132

SAHRAWAT, K. L.; KEENEY, D. R. Nitrous oxide emission from soils. **Advances in Soil Science**, v. 4, p. 103-148, 1986. DOI: 10.1007/978-1-4613-8612-4_2

SAITO, A.; TANABATA, S.; TANABATA, T.; TAJIMA, S.; UENO, M.; ISHIKAWA, S.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; OHYAMA, T. Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 4464-4480, 2014. DOI: 10.3390/ijms15034464

SALAS, A.; TORTOSA, G.; HIDALGO-GARCÍA, A.; DELGADO, A.; BEDMAR, E. J.; RICHARDSON, D. J.; GATES, A. J.; DELGADO, M. J. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02915

SALVAGIOTTI, F.; CASSMAN, K. G.; SPECHT, J. E.; WALTERS, D. T.; WEISS, A.; DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, p. 1-13, 2008. DOI: 10.1016/j.fcr.2008.03.001

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed., Cold Spring Harbor Press, v. 2, p. 8004-8102, 2001.

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; MINAMISAWA, K. New Method of Denitrification Analysis of *Bradyrhizobium* Field Isolates by Gas Chromatographic Determination of ¹⁵N-Labeled N₂. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2886-2891, 2004. DOI: 10.1128/AEM.70.5.2886–2891.2004

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; HIRAYAMA, J.; ITAKURA, M.; MITSUI, H.; EDA, S.; MINAMISAWA, K. Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* reduces N₂O surrounding the

soybean root system via nitrous oxide reductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2526-2532, 2006b. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2526-2532.2006

SAMESHIMA-SAITO, R.; CHIBA, K.; MINAMISAWA, K. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean Bradyrhizobia. **Microbes and Environments**, v. 21, p. 174-184, 2006a. DOI: 10.1264/jsme2.21.174

SÁNCHEZ, C.; GATES, A. J.; MEAKIN, G. E.; UCHIUMI, T.; GIRARD, L.; RICHARDSON, D. J.; BEDMAR, E. J.; DELGADO, M. J. Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 5, p. 702-711, 2010. DOI: 10.1094/MPMI-23-5-0702

SÁNCHEZ, C.; CABRERA, J. J.; GATES, A. J.; BEDMAR, E. J.; RICHARDSON, D. J.; DELGADO, M. J. Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 184-188, 2011. DOI: 10.1042/BST0390184

SÁNCHEZ, C.; MINAMISAWA, K. Nitrogen cycling in soybean rhizosphere: sources and sinks of nitrous oxide (N₂O). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019 DOI: 10.3389/fmicb.2019.01943

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. Sistema brasileiro de classificação de solos. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2018. 531p.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, p. 1-22, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0932-0

SASAKURA, F.; UCHIUMI, T.; SHIMODA, Y.; SUZUKI, A.; TAKENOUCHI, K.; HIGASHI, S.; ABE, M. A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 19, p. 441-450, 2006. DOI: 10.1094/MPMI-19-0441

SAZANOV, L. A.; HINCHLIFFE, P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. **Science**, v. 311, p. 1430-1436, 2006. DOI: 10.1126/science.1123809

SHAH, A. Determination of Biological Nitrogen Fixation Induced N₂O Emission from Arable Soil by Using a Closed Chamber Technique. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 10, 2014. DOI:10.1155/2014/685168

SHAPLEIGH, J. P. The denitrifying prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The prokaryotes**. New York: Springer, 2006, p. 769-792.

SHCHERBAK, I.; MILLAR, N.; ROBERTSON, G. P. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N₂O) emissions to fertilizer nitrogen. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 111, p. 9199-9204, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1322434111

SHIINA, Y.; ITAKURA, M.; CHOI, H.; SAEKI, Y.; HAYATSU, M.; MINAMISAWA, K. Relationship between soil type and N₂O reductase genotype (*nosZ*) of indigenous soybean bradyrhizobia: *nosZ*minus populations are dominant in andosols. **Microbes Environments**, v. 29, p. 420-426, 2014. DOI: 10.1264/jsme2.ME14130

SHIMODA, Y.; SHIMODA-SASAKURA, F.; KUCHO, K.; KANAMORI, N.; NAGATA, M.; SUZUKI, A.; ABE, M.; HIGASHI, S.; UCHIUMI, T. Overexpression of class 1 plant hemoglobina genes enlases symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. **The Plant Journal**, v. 57, p. 254-263, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03689.x

SIMON, J.; VAN SPANNING, R.J.M.; RICHARDSON, D.J. The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1777, p. 1480-1490, 2008. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.09.008

SIQUEIRA NETO, M.; PICCOLO, M. C.; COSTA JUNIOR, C.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. Emissão de gases do efeito estufa em diferentes usos da terra no bioma cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 63-76, 2011. DOI: 10.1590/S0100-06832011000100006

SIQUEIRA, A.F.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; SOUZA, R.C.; RODRIGUES, E.P.; ALMEIDA, L.G.P.; BARCELLOS, F.G.; BATISTA, J.S.S.; NAKATANI, A.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VASCONCELOS, A.T.R.; HUNGRIA, M. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. **BMC Genomics**, v. 15, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-420

SIQUEIRA, A.F.; MINAMISAWA, K.; SÁNCHEZ, C. Anaerobic reduction of nitrate to nitrous oxide is lower in *Bradyrhizobium japonicum* than in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. **Microbes and Environments**, v. 32, n. 4, p. 398-401, 2017. DOI: 10.1264/jsme2.ME17081

STEIN, S.; SELESI, D.; SCHILLING, R.; PATTIS, I.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Microbial activity and bacterial composition of H₂-treated soils with net CO₂ fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1938-1945, 2005. DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.02.035

STROHM, T.O.; GRIFFIN, B.; ZUMFT, W. G.; SCHINK, B. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p.1420-1424, 2007. DOI: 10.1128/AEM.02508-06

SUENAGA, T.; RIYA, S.; HOSOMI, M.; TERADA, A. Biokinetic characterization and activities of N₂O-reducing bacteria in response to various oxygen levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00697

SVENSSON-EK, M.; ABRAMSON, J.; LARSSON, G.; TORNROTH, S.; BRZEZINSKI, P.; IWATA, S. The X-ray crystal structures of wild-type and EQ (I-286) mutant cytochrome c

oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, p. 329-339, 2002. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00619-8.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 6ª ed., Artmed, 2017. 858 p.

THOMSON, A. J.; GIANNOPOULOS, G.; PRETTY, J.; BAGGS, E. M.; RICHARDSON, D. J. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, p. 1157-1168, 2012. DOI: 10.1098/rstb.2011.0415

THROBÄCK, I. N.; ENWALL, K.; JARVIS, Å.; HALLIN, S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 401-417, 2004. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.04.011

TOMINAGA, A.; NAGATA, M.; FUTSUKI, K.; ABE, H.; UCHIUMI, T.; ABE, M.; KUCHO, K.; HASHIGUCHI, M.; AKASHI, R.; HIRSCH, A. M.; ARIMA, S.; SUZUKI, A. Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant enhanced nitrogen fixation of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1965-1976, 2010. DOI: 10.1104/pp.109.142638

TORRES, M. J.; BUENO, E.; JIMÉNEZ-LEIVA, A.; CABRERA, J. J.; BEDMAR, E. J.; MESA, S.; DELGADO, M.J. FixK2 is the main transcriptional activator of *Bradyrhizobium diazoefficiens* nos RZDYFLX genes in response to low oxygen. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-16, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01621

TORTOSA, G.; HIDALGO, A.; SALAS, A.; BEDMAR, E. J.; MESA, S.; DELGADO, M. J. Nitrate and flooding induce N₂O emissions from soybean nodules. **Symbiosis**, v. 67, p. 125-133, 2015. DOI: 10.1007/s13199-015-0341-3

UCHIDA, Y.; AKIYAMA, H. Mitigation of postharvest nitrous oxide emissions from soybean ecosystems: a review. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, p. 477-487, 2013. DOI: 10.1080/00380768.2013.805433

UCHIDA, Y.; VON REIN, I. Mitigation of nitrous oxide emissions during nitrification and denitrification processes in agricultural soils using enhanced efficiency fertilizers. **Soil Contamination and Alternatives for Sustainable Development**, p. 73-88, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.81548

UNEP - United Nations Environment Programme (2013). Drawing down N₂O to protect climate and the ozone layer. A UNEP Synthesis Report. United Nations Environment Programme (UNEP), Nairobi, Kenya. Disponível em: http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/8489/-Drawing%20down%20N2O%20to%20protect%20climate%20and%20the%20ozone%20layer_%20a%20UNEP%20synthesis%20report-2013UNEPN2Oreport.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acessado em 10 de set. de 2020.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, B.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Canberra: ACIAR - Australian Centre for International Agricultural Research, 2008.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, v. 65, p. 211-228, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00088-X

URATSU, S. L.; KEYSER, H. H.; WEBER, D. F.; LIM, S. T. Hydrogen uptake (HUP) activity of *Rhizobium japonicum* from major U.S. soybean production areas. **Crop Science**, v. 22, p. 600-602, 1982. DOI: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200030040x

URQUIAGA, S.; SISTI, C. P. J.; ZOTARELLI, L.; ALVES, B. J. R. Manejo de sistemas agrícolas para seqüestro de carbono no solo. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Eds.) Conhecimentos e técnicas avançadas para o estudo dos processos da biota no sistema solo-planta. Brasília: Embrapa, p. 257-273, 2005.

URQUIAGA, S.; ZILLI, J.E.; HUNGRIA, M.; MENEZES, W.; MARTINS M.R.; JANTALIA, C.P.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. A inoculação com bactérias diazotróficas atende o potencial de rendimento da soja superior a 6.800 kg ha⁻¹. In: Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, Foz do Iguaçu, 2018. Anais... Foz do Iguaçu: XIX RELARE, 2018. p. 21.

USYSKIN-TONNE, A.; HADAR, Y.; MINZ, D. Altering N₂O emissions by manipulating wheat root bacterial Community. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44124-3.

VAN DER WEERDEN, T.J.; LUO, J.; DI, H.J.; PODOLYAN, A.; PHILLIPS, R.L.; SAGGAR, S.; KLEIN, C.A.M.; COX, N.; ETTEMA, P.; RYS, G. Nitrous oxide emissions from urea fertiliser and effluent with and without inhibitors applied to pasture. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 219, p. 58-70, 2016. DOI: 10.1016/j.agee.2015.12.006

VAN SPANNING, R.J.; DELGADO, M.J.; RICHARDSON, D. J. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Eds.) **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**. Dordrecht: Springer, 2005, p. 277-342.

VAN SPANNING, R. J.; RICHARDSON, D. J.; FERGUSON, S. J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W.E. (Eds.) **Biology of the Nitrogen Cycle**. Amsdertam: Elsevier, 2005, p. 3-20.

VIGNAIS, P. M.; BILLOUD, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 10, p. 4206-4272, 2007. DOI: 10.1021/cr050196r

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A.J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n.17, p. 4153-4154, 1993. DOI: 10.1093/nar/21.17.4153

WANG, W.; YANG, M.; SHEN, P.; ZHANG, R.; QIN, X.; HAN, J.; LI, Y.; WEN, X.; LIAO, Y. Conservation tillage reduces nitrous oxide emissions by regulating functional genes for ammonia oxidation and denitrification in a winter wheat ecosystem. **Soil & Tillage Research**, v. 194, 2019. DOI: 10.1016/j.still.2019.104347

WMO - World Meteorological Organization (2018). Greenhouse gas bulletin-N° 14: The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2017. Geneva, Switzerland. Disponível em: https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=5455. Acessado em 06 de jul. de 2020.

WOLIY, K.; DEGEFU, T.; FROSTEGÅRD, Å. Host range and symbiotic effectiveness of N₂O reducing *Bradyrhizobium* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02746

WOOD, N. J.; ALIZADEH, T.; RICHARDSON, D.J.; FERGUSON, S.J.; MOIR, J.W.B. Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 157-170, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02859.x

XU, Y.; HAN, Y. P.; LI, Q. L.; SUN, J. H.; SU, X. F. Impact of internal recycle ratio on nitrous oxide generation from anaerobic/anoxic/oxic biological nitrogen removal process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 106, p. 11-18, 2016. DOI: 10.1016/j.bej.2015.11.005

YAGI, T.; MATSUNO-YAGI, A. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. **Biochemistry**, v. 42, p. 2266-2274, 2003. DOI: 10.1021/bi027158b

YANG, L.; CAI, Z. The effect of growing soybean (*Glycine max* L.) on N₂O emission from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1205-1209, 2005. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.08.027

YIP C. Y.; HARBOUR M. E.; JAYAWARDENA, K.; FEARNLEY, I. M.; SAZANOV, L. A. Evolution of respiratory complex I “supernumerary” subunits are present in the α -proteobacterial enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 5023-5033, 2011. DOI: 10.1074/jbc.m110.194993

YOSHINARI, T.; KNOWLES, R. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, p. 705-710, 1976.

ZABLOTOWICZ, R.M.; FOCHT, D.D. Denitrification, and anaerobic, nitrate-dependent acetylene reduction in cowpea *Rhizobium*. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 445-448, 1979. DOI: 10.1099/00221287-111-2-445

ZHANG, J. S.; ZHANG, F. P.; YANG, J. H.; WANG, J. P.; CAI, M. L.; LI, C. F.; CAO, C. G. Emissions of N₂O and NH₃, and nitrogen leaching from direct seeded rice under different tillage practices in central China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 140, p. 164-173, 2011. DOI: 10.1016/j.agee.2010.11.023

ZHANG, Y.; HE, X.; DONG, Z. Effect of hydrogen on soil bacterial community structure in two soils as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. **Plant and Soil**, v. 320, p. 295-305, 2009. DOI: 10.1007/s11104-009-9894-3.

ZHONG, Z.; LEMKE, R. L.; NELSON, L. M. Nitrous oxide emissions associated with nitrogen fixation by grain legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2283-2291, 2009. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.08.009

ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Agro@mbiente On-line**, v. 4, p. 56-61, 2010. DOI: 10.18227/1982-8470ragro.v4i2.392

ZILLI, J. E.; PEREIRA, G. M. D.; FRANÇA JÚNIOR, I.; SILVA, K. D.; HUNGRIA, M.; ROUWS, J.R.C. Dynamic of rhizobia in the soil during the dry season in cerrado of Roraima. **Acta Amazonica**, v. 43, p. 153-160, 2013. DOI: 10.1590/S0044-59672013000200004

ZILLI, J. E.; ALVES, B. J. R.; ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; SOARES, L. H. B.; CASSÁN, F.; CASTELLANOS, M.O.; O'HARA, G. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant and Soil**, v. 451, p. 5-24, 2019. DOI: 10.1007/s11104-019-04187-7

ZILLI, J. E.; PACHECO, R. S.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLE, O. J.; URQUIAGA, S.; HUNGRIA, M. Biological N₂ fixation and yield performance of soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 2021. DOI: 10.1007/s10705-021-10128-7

ZOTARELLI, L.; ZATORRE, N. P.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; FRANCHINI, J. C.; ALVES, B. J. R. Influence of no-tillage and frequency of a green manure legume in crop rotations for balancing N outputs and preserving soil organic C stocks. **Field Crops Research**, v. 132, p. 185-195, 2012. DOI: 10.1016/j.fcr.2011.12.013

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 533-616, 1997. DOI: 10.1128/61.4.533-616.1997.