

Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja

Rosinei Aparecida de Souza⁽¹⁾, Mariangela Hungria⁽²⁾, Julio Cezar Franchini⁽²⁾, Carlos Dias Maciel⁽³⁾, Rubens José Campo⁽²⁾ e Dimas Augusto Morozin Zaia⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, Caixa Postal 60001, CEP 86051-990 Londrina, PR. E-mail: rosyquimica@yahoo.com.br, damazaia@uel.br ⁽²⁾Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br, franchin@cnpso.embrapa.br, rjcampo@cnpso.embrapa.br ⁽³⁾Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Engenharia Elétrica, CEP 13566-590 São Carlos, SP. E-mail: maciel@sel.eesc.usp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar um conjunto mínimo de parâmetros para o monitoramento, em campo, da microbiota do solo e da fixação biológica do N₂ (FBN) pela soja. Os ensaios foram conduzidos em áreas de plantios comerciais (safra 2002/2003) e experimentais (safra 2004/2005), em blocos ao acaso. O C e o N da biomassa microbiana (CBM e NBM) mostraram-se adequados para a avaliação quantitativa da microbiota do solo e ambos os parâmetros foram correlacionados significativamente, portanto, apenas um deles precisa ser determinado. Foram obtidas correlações positivas e significativas entre a massa da parte aérea seca das plantas (MPAS) e o CBM e o NBM. A análise do DNA total do solo por eletroforese em géis desnaturantes (DGGE) detectou alterações qualitativas na microbiota do solo, relacionadas à homogeneidade da área e a diferenças entre tratamentos, áreas e coletas. A massa de nódulos secos (MNS) foi o melhor parâmetro para a avaliação da nodulação. Correlações significativas foram constatadas entre a MPAS e o N total acumulado na parte aérea (NTPA). Resultados semelhantes foram observados entre a MPAS e o N de ureídeos (NTU). O monitoramento da FBN pela soja pode ser realizado apenas pela determinação da MNS e da MPAS.

Termos para indexação: *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, biomassa microbiana, fixação biológica do nitrogênio, monitoramento ambiental.

Minimal set of parameters for evaluation soil microbiota and biological nitrogen fixation in soybean

Abstract – The objective of this work was to evaluate and validate a minimum set of parameters capable of monitoring, under field conditions, soil microbes and/or the biological N₂ fixation process with the soybean crop. The field trials were performed in commercial fields (2002/2003) and experimental areas (2004/2004), with complete randomized blocks design. Microbial biomass C (MBC) and N (MBN) were adequate for the quantitative evaluation of soil microbes; the parameters were significantly correlated therefore the determination of only one of them is sufficient. Positive and significant correlations were also obtained between the parameters of shoot dry weight (SDW) and MBC and MBN. The analysis of total soil DNA by the denaturing gradient gel electrophoresis method (DGGE) detected qualitative changes in soil microbes, related to the homogeneity of the area, as well as to differences among treatments, areas and harvests. Nodule dry weight (NDW) was the most suitable parameter for the evaluation of nodulation. Significant correlations were obtained between the SDW and the total N accumulated in shoots (TNS). Similar results were obtained between SDW and total N-ureides (TNU). Monitoring of the symbiosis in soils traditionally cropped with soybean and poor on N may be achieved only by the determination of NDW and SDW.

Index terms: *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, microbial biomass, biological nitrogen fixation, environmental monitoring.

Introdução

O cultivo comercial de plantas transgênicas iniciou-se em 1996 e cresceu exponencialmente desde então, tendo atingido aproximadamente 87,2 milhões de hectares em 2005 e envolvido mais de 8 milhões de agricultores em 17 países; 60% dessa extensão são cultivados com soja (Brookes & Barfoot, 2005, 2006).

Esses autores relacionam vários benefícios econômicos, ambientais e sociais gerados em uma década de comercialização de transgênicos, incluindo maior produtividade, redução no uso de agrotóxicos e no gasto de combustíveis, menor emissão de gases com efeito estufa, e maior sequestro de C. Por sua vez, questões relacionadas à segurança dos transgênicos, à saúde humana e ao ambiente são muito discutidas e

incluem a possibilidade de fluxo gênico para plantas selvagens, domesticadas, ou ervas daninhas, e a tolerância aos agrotóxicos, além de questões éticas, socioeconômicas, de propriedade intelectual e de direito do consumidor (Gepts & Papa, 2003; Huffman et al., 2003; Gepts, 2004).

A estimativa do impacto ambiental, também denominada de análise de risco, é definida como um processo de avaliação, que inclui a identificação das incertezas, das probabilidades e da severidade dos efeitos adversos ao homem, ou ao meio ambiente, após a exposição a determinadas fontes de risco.

O reconhecimento da importância dos microrganismos para a qualidade do solo e da fixação biológica do N₂ (FBN) para a nutrição das leguminosas tem demandado a análise de diversos parâmetros microbiológicos em ensaios de avaliação de impactos ambientais. Como exemplo, a aprovação do uso comercial da soja transgênica pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) vem sendo condicionada à realização de planos de monitoramento pré ou pós-comerciais, em escala de propriedades comerciais ou de ensaios experimentais, nos quais estão incluídas avaliações da microbiota do solo. A definição de um conjunto mínimo de parâmetros, sensíveis, com baixa variabilidade e custo e validado para as condições brasileiras é relevante para a análise de risco ambiental em estudos que envolvem transgênicos, ou quaisquer novas tecnologias aplicadas à cultura da soja, inclusive o melhoramento genético tradicional.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar um conjunto mínimo de parâmetros para o monitoramento, em campo, da microbiota do solo e da fixação biológica do N₂ (FBN) pela soja.

Material e Métodos

Foram realizadas avaliações em dois conjuntos de ensaios, conduzidos por duas safras (2002/2003 e 2004/2005), nas principais regiões produtoras de soja. O Ensaio 1 (2002/2003) foi conduzido com soja convencional em propriedades de agricultores, localizadas em seis municípios tradicionais de produção de soja: São Luiz Gonzaga (RS), Passo Fundo (RS), Ponta Grossa (PR), Cascavel (PR), Londrina (PR) e Dourados (MS).

Os ensaios nessas propriedades foram instalados no delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições. As coletas para as análises microbiológicas foram realizadas nos estádios V4 (terceira folha trifoliada

estendida e a quarta aberta) e R2 (florescimento pleno) do desenvolvimento da soja. O Ensaio 2 foi conduzido em sete estações experimentais, localizadas em regiões produtoras de soja: Ponta Grossa (PR), Londrina (PR), Santo Antônio da Posse (SP), Sete Lagoas (MG), Santo Antônio de Goiás (GO), Brasília (DF) e Planaltina (DF). As cultivares de soja utilizadas foram a Conquista e a Conquista evento transgênico, constituída de uma linhagem com características fenotípicas desejáveis, que contém uma cópia única de gene para tolerância a um herbicida específico. Os ensaios foram conduzidos com o delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições e três tratamentos: 'Conquista' evento transgênico e herbicida específico, 'Conquista' evento transgênico e herbicidas convencionais, 'Conquista' convencional e herbicidas convencionais. As coletas para as análises microbiológicas foram realizadas nos estádios de pré-plantio (PP), R2 e, em cinco locais, em R8 (maturação plena). Detalhes sobre as áreas e condução dos ensaios constam do trabalho de Souza et al. (2008).

De cada uma das parcelas foram coletadas sete subamostras deformadas de solo (0–10 cm), na área total da parcela, antes do plantio, para a análise quantitativa e qualitativa da microbiota do solo. Na avaliação quantitativa do C da biomassa microbiana (CBM), utilizou-se o método de fumigação-extração modificado de Vance et al. (1987) e, para o N (NBM), o método de Brookes et al. (1985). A respiração basal (RB) foi avaliada pela determinação do C do CO₂ (C-CO₂) liberado em amostras não-fumigadas, incubadas por dez dias, e capturado em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N. O quociente metabólico (qCO_2) foi calculado pela divisão da RB pelo CBM. Para a determinação qualitativa da microbiota do solo, o DNA total do solo foi extraído e amplificado com primers específicos para a região que codifica para o gene ribossômico 16S rRNA e os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante de uréia (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Souza et al., 2008).

Nas avaliações da simbiose soja-rizóbio, inicialmente foi determinada a população de rizóbios capazes de nodular a soja, pelo método do número mais provável (NMP) com contagem em plantas. No estádio R2, dez plantas de soja foram coletadas ao acaso, de cada parcela, para a determinação dos parâmetros número (NN), massa de nódulos secos (MNS) e massa da parte aérea seca (MPAS). O N total da parte aérea (NTPA)

foi avaliado por digestão úmida, seguida pela determinação da concentração de N, utilizando um analisador automático (Tecator Automatic N Analyzer, Suécia). Os pecíolos foram moídos (malha de 20 mesh) separadamente para a análise do N total sob a forma de ureídios (NTU). O teor de nitrato nos pecíolos também foi determinado, para a avaliação da percentagem do N total sob a forma de ureídios (%NU) (Herridge & Peoples, 1990). A ocupação dos nódulos pelas estirpes dominantes nos solos brasileiros foi realizada em 40 nódulos, escolhidos ao acaso, de cada parcela, pelo método de imunoaglutinação, contra os antígenos somáticos termoestáveis preparados com as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019.

No Ensaio 2, os teores de P e K na parte aérea das plantas coletadas em R2 também foram determinados. Após a digestão do material moído por via seca em mufla, os teores de P e K foram analisados por espectroscopia de emissão atômica induzida por plasma (ICP-AES).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade das variáveis e de homogeneidade das variâncias (ANOVA) (SAS, 1999). Quando comprovadas a normalidade e a homogeneidade, foram calculadas a média aritmética (\bar{x}) e o desvio-padrão (s), e resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se o SAS ou o Microsoft Excel. Na estimativa da precisão experimental, foi utilizado o coeficiente de variação (CV) (desvio-padrão/média, s/\bar{x}). A classificação do CV nos níveis baixo, médio, alto e muito alto foi realizada após a análise da média aritmética (\bar{x}) e do desvio-padrão da média (s) de cada valor de CV (Souza et al., 2008). Coeficientes de correlação entre os diversos parâmetros foram estimados com o programa Microsoft Excel e, também, na página da University of Amsterdam (2005). A análise dos perfis de DNA obtidos na análise de DGGE foi realizada com o programa Bionuméric (v. 1.50) (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica), utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

No Ensaio 1, quando os parâmetros de CBM, RB e $q\text{CO}_2$ foram correlacionados (Tabela 1), destacaram-se as correlações positivas e significativas entre o CBM e a RB, tanto no estádio V4 ($r = 0,83$, $p < 0,001$), como no estádio R2 ($r = 0,90$, $p < 0,001$). A correlação entre esses dois parâmetros também foi positiva e estatisticamente significativa, quando os dados das duas coletas foram analisados em conjunto ($r = 0,84$, $p < 0,001$), (Figura 1). Em relação ao $q\text{CO}_2$, não houve correlação

com a RB em cada coleta, contudo, houve correlação negativa e significativa, a $p < 0,05$, com o CBM, tanto em V4, como em R2, o que indica que, concomitantemente com o incremento no CBM, a microbiota tendeu a incrementar a eficiência metabólica, provavelmente pela seleção de microrganismos mais eficientes na conversão dos nutrientes disponíveis, particularmente o C (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes⁽¹⁾ de correlação entre os parâmetros de C da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g g}^{-1}$), respiração basal (RB, $\mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e quociente metabólico [$(q\text{CO}_2, \mu\text{g de CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C microbiano h}^{-1}) \times 10^4$], avaliados em solos com soja nos estádios V4 e R2, e os parâmetros de crescimento e N acumulado em soja no estádio R2. Ensaio 1, conduzido na safra 2002/2003, com soja convencional e três repetições.

Parâmetros	V4			R2		
	CBM	RB	$q\text{CO}_2$	CBM	RB	$q\text{CO}_2$
CBM - V4	1,00					
RB - V4	0,83	1,00				
$q\text{CO}_2$ - V4	-0,54	-0,03	1,00			
CBM - R2	-0,44	-0,27	0,42	1,00		
RB - R2	-0,26	0,02	0,55	0,90	1,00	
$q\text{CO}_2$ - R2	0,87	0,78	-0,31	-0,51	-0,21	1,00
Cél. Log	0,20	0,12	-0,18	-0,42	-0,44	0,19
NN	-0,30	-0,21	0,14	0,21	0,15	-0,34
MNS	-0,54	-0,38	0,34	0,36	0,26	-0,50
MPAS	0,52	0,40	-0,39	-0,59	-0,59	0,39
NTPA	0,32	0,12	-0,50	-0,38	-0,48	0,15
NU%	0,40	0,37	-0,11	0,12	0,24	0,29
NTU	0,42	0,23	-0,48	-0,29	-0,34	0,23
ENNT	0,80	0,57	-0,54	-0,49	-0,39	0,67
ENNU	0,81	0,59	-0,53	-0,44	-0,33	0,67

⁽¹⁾ $r \geq 0,61$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,48$ para $p < 0,05$.

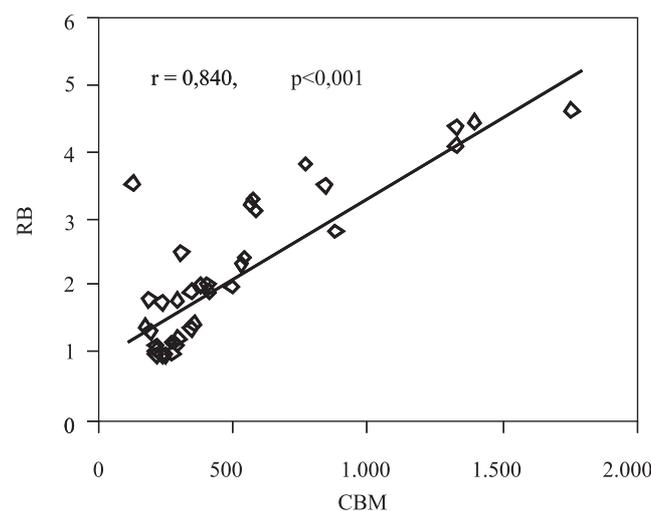


Figura 1. Correlação entre o C da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g g}^{-1}$) e a respiração basal (RB, $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) em seis locais cultivados com soja (Ensaio 1). Os solos foram coletados nos estádios V4 e R2 do crescimento da soja.

No Ensaio 1, o CBM e a RB foram significativamente correlacionados, por isso, no Ensaio 2, decidiu-se pela avaliação do CBM e a inclusão de um novo parâmetro, o NBM. As correlações obtidas entre o CBM e o NBM, avaliados em R2, em cada um dos sete locais, não foram estatisticamente significativas (Tabela 2). Entretanto, quando todos os dados coletados em R2 foram analisados em conjunto, constatou-se correlação positiva e altamente significativa ($r = 0,77$, $p < 0,001$) (Figura 2 A). Além disso, o CBM e o NBM também foram correlacionados significativamente quando todos os locais e épocas (PP, R2 e, em cinco locais, em R8) foram considerados ($r = 0,75$, $p < 0,001$) (Figura 2 B).

Tabela 2. Coeficientes⁽¹⁾ de correlação entre os parâmetros de C e N da biomassa microbiana (CBM e NBM, $\mu\text{g g}^{-1}$), massa de nódulos (MNS, miligramas por planta) e da parte aérea secos (MPAS, gramas por planta) e N total acumulado na parte aérea (NTPA, miligramas por planta) avaliados em R2. Ensaio 2, safra 2004/2005.

Parâmetros	CBM	NBM	MNS	MPAS	NTPA
Ponta Grossa					
CBM	1,00				
NBM	0,45	1,00			
MNS	0,02	-0,11	1,00		
MPAS	0,19	-0,04	0,25	1,00	
NTPA	0,32	-0,19	0,41	0,78	1,00
Londrina					
NBM	0,13	1,00			
MNS	0,26	-0,07	1,00		
MPAS	-0,54	0,12	-0,31	1,00	
NTPA	-0,49	0,38	-0,36	0,89	1,00
Santo Antônio da Posse					
NBM	0,11	1,00			
MNS	0,39	-0,55	1,00		
MPAS	0,22	0,15	0,27	1,00	
NTPA	0,15	0,27	-0,08	0,76	1,00
Sete Lagoas					
NBM	-0,42	1,00			
MNS	0,10	-0,04	1,00		
MPAS	0,39	-0,45	0,44	1,00	
NTPA	0,22	-0,46	0,26	0,85	1,00
Planaltina					
NBM	0,02	1,00			
MNS	-0,03	0,38	1,00		
MPAS	-0,05	0,16	-0,12	1,00	
NTPA	-0,13	0,26	-0,14	0,95	1,00
Brasília					
NBM	0,50	1,00			
MNS	0,11	0,13	1,00		
MPAS	0,13	0,15	-0,16	1,00	
NTPA	-0,13	-0,21	-0,28	0,90	1,00
Santo Antônio de Goiás					
NBM	-0,10	1,00			
MNS	-0,06	0,16	1,00		
MPAS	-0,24	0,13	-0,39	1,00	
NTPA	-0,30	0,13	-0,27	0,94	1,00

⁽¹⁾ $r \geq 0,79$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,65$ para $p < 0,05$.

Desde o estudo pioneiro de Jenkinson (1966), dezenas de trabalhos comprovaram que a determinação da biomassa microbiana do solo pode fornecer informações relevantes sobre o funcionamento dos ecossistemas e sobre a qualidade do solo, havendo, inclusive, indicações de que os parâmetros microbiológicos apresentam maior sensibilidade do que os químicos e físicos, refletindo rapidamente alterações pelo manejo do solo ou das culturas (Wardle, 1992, 1998; Balota et al., 1998, 2003; Franchini et al., 2007). Com base nos resultados obtidos nos Ensaio 1 e 2, pode-se concluir que qualquer um

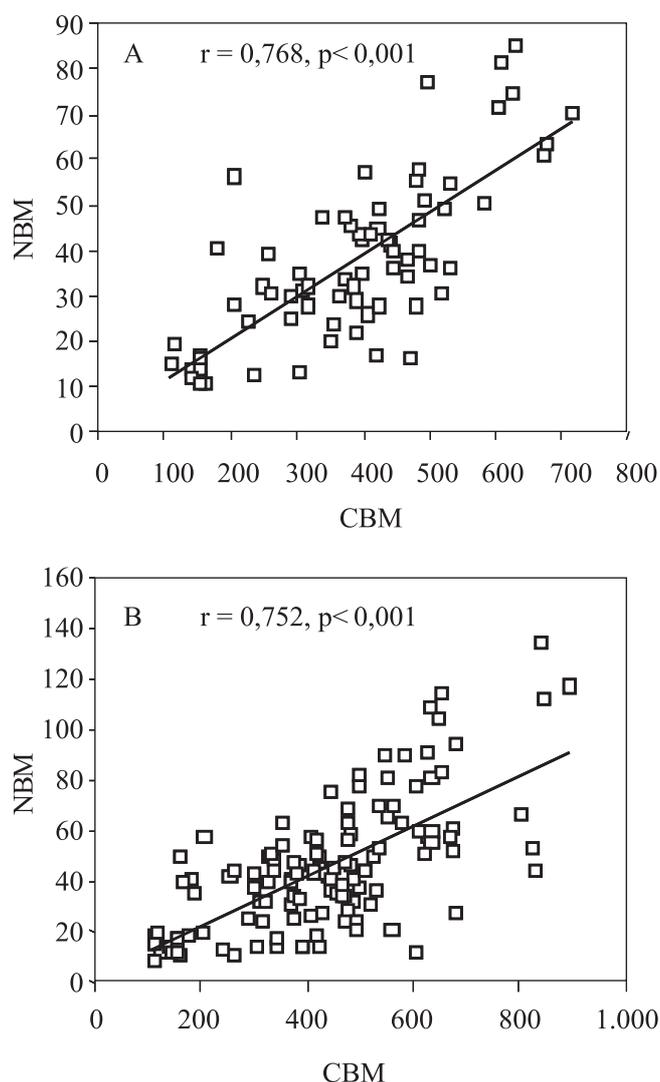


Figura 2. Correlações entre o C (CBM) e o N (NBM) da biomassa microbiana do solo ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sete locais amostrados (Ensaio 2). A: dados obtidos em sete locais na coleta realizada em R2; B: dados obtidos em sete locais nas coletas no pré-plantio e em R2 e em cinco locais em R8.

dos três parâmetros – CBM, RB ou NBM – pode ser utilizado para a avaliação quantitativa da microbiota do solo. A vantagem da utilização do CBM reside na maior disponibilidade de dados, o que facilita a construção de bancos de dados.

Em relação à avaliação qualitativa da biomassa microbiana pelo DGGE, no estudo de Souza et al. (2008) foi evidenciado que a análise de quatro ou três repetições por tratamento, ou, ainda, de duas repetições combinadas (cada uma representou duas repetições em campo) foi válida para identificar a homogeneidade entre repetições e detectar diferenças qualitativas na microbiota do solo, relacionadas aos diferentes tratamentos, locais e épocas de colheita.

Neste trabalho, os perfis foram analisados visando a estabelecer a dissimilaridade máxima aceitável entre repetições em um mesmo local, com o uso do programa Bionumerics, o algoritmo de UPGMA e o coeficiente de Jaccard. Constatou-se que, quando a tolerância do programa for estabelecida em 5%, o nível de dissimilaridade máximo aceitável entre repetições deve ser de 5%. Um exemplo está demonstrado na Figura 3, em que os perfis das três repetições de São Luiz Gonzaga foram distintos, com dissimilaridade superior a 5%, o que indica falta de homogeneidade da área, ao contrário de Dourados, onde os perfis foram 99% similares. No caso da tolerância do programa ser fixada em 2%, o limite de dissimilaridade máxima aceitável pode ser superior, de até 10%.

No Ensaio 1, quando os parâmetros utilizados na avaliação da FBN foram correlacionados, verificou-se

que o NN foi correlacionado positivamente com a MNS ($r = 0,91$, $p < 0,001$) (Tabela 3). Conseqüentemente, no caso deste trabalho, conduzido em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, somente um dos dois parâmetros necessitaria ser avaliado, sendo preferível optar pela MNS, pela maior praticidade, menor variabilidade espacial e temporal e, também, pela melhor correlação com o desempenho simbiótico (Döbereiner, 1966; Bohrer & Hungria, 1998; Hungria & Bohrer, 2000).

Correlações positivas e significativas foram constatadas entre a MPAS e o NTPA ($r = 0,88$, $p < 0,001$), bem como entre a MPAS e o N total da planta sob a forma de ureídos (NTU) ($r = 0,81$, $p < 0,001$); além disso, o NTU foi altamente correlacionado com o NTPA ($r = 0,94$, $p < 0,001$) (Tabela 3). Em condições axênicas, Haydock et al. (1980) verificaram que as estirpes mais eficientes poderiam ser selecionadas com base na biomassa de plantas, ou somente da parte aérea, sem a necessidade de determinar o teor de N nos tecidos. Bohrer & Hungria (1998) constataram, também em condições axênicas, correlação positiva, elevada e significativa ($r = 0,88$, $p < 0,001$) entre a MPAS e o NTPA. Posteriormente, esses resultados foram confirmados em solo não-estéril, em condições de casa de vegetação ($r = 0,91$, $p < 0,001$) (Hungria & Bohrer, 2000).

A ocupação dos nódulos pelas estirpes não foi correlacionada significativamente com a MPAS, com o NTPA, ou com o NTU (Tabela 3). Limitações à

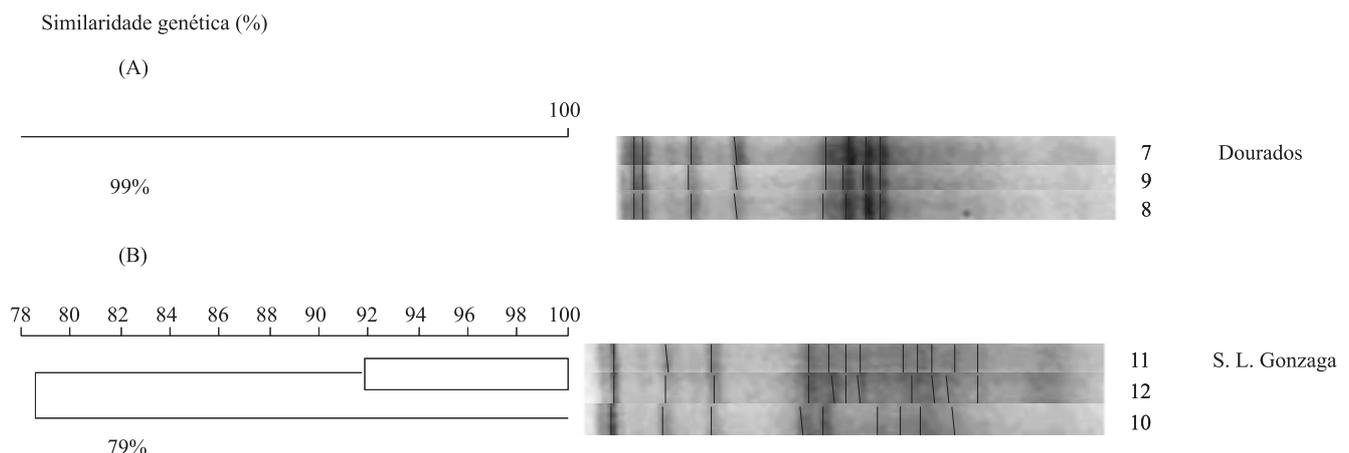


Figura 3. Análise de agrupamento dos perfis de DNA total do solo após a amplificação com primers para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Perfis obtidos em cada uma das três repetições do Ensaio 1, em Dourados (A) e São Luiz Gonzaga (B), utilizando o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%.

determinação da ocupação dos nódulos foram apontadas por Souza et al. (2008): nódulos ocupados por mais de uma estirpe; nódulos sem reação conhecida; variabilidade (CV%) aceitável para as estirpes que ocuparam a maior percentagem dos nódulos (SEMIA 587, 5019 e 5079), mas não para a estirpe menos competitiva (SEMIA 5080); e dificuldade em separar estirpes com reação sorológica semelhante, por exemplo, a SEMIA 566 e a SEMIA 5079. Essas limitações dificultam a interpretação dos resultados obtidos, razão pela qual não deve ser incluído na avaliação da eficiência agrônômica de inoculantes para leguminosas (Relare, 2000). A avaliação da ocupação dos nódulos, no entanto, é importante em estudos de ecologia de rizóbios – por exemplo, de introdução de estirpes em solos isentos de *Bradyrhizobium* (Mendes et al., 2004) –, bem como para monitorar o efeito da reinoculação maciça com novas estirpes em solos com população naturalizada (Nishi & Hungria, 1996). Neste estudo, a MNS foi correlacionada positivamente com a ocupação pelas estirpes SEMIA 587 e 5019, ao passo que a eficiência dos nódulos foi correlacionada negativamente com essas duas estirpes e positivamente com a SEMIA 5080. Desse modo, as estirpes SEMIA 587 e 5019 resultaram em maior nodulação, mas a SEMIA 5080 foi a mais eficiente no processo de FBN, confirmando relatos anteriores (Nishi & Hungria, 1996; Mendes et al., 2004; Hungria et al., 2006).

No Ensaio 2, na coleta R2, em cada um dos sete locais, também se destacaram as correlações

significativas entre a MPAS e o NTPA (Tabela 2). Quando os dados dos sete locais foram analisados em conjunto, novamente obteve-se correlação positiva e altamente significativa ($r = 0,96$) (Figura 4), confirmando os resultados obtidos no Ensaio 1. Pode-se concluir, portanto, que em solos com baixos teores de N e na ausência de fertilizantes nitrogenados, a avaliação da MPAS representa um forte indicativo do estado nutricional da soja em N – isso porque, no Brasil, em geral a soja recebe todos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, exceto o N, que se torna o nutriente limitante ao crescimento das plantas.

Para verificar se o crescimento das plantas (MPAS) estava, de fato, relacionado ao N, procedeu-se à análise dos teores de P e K nos mesmos tecidos, uma vez que esses são os dois nutrientes, após o N, acumulados em quantidade maior nos tecidos da soja. Constatou-se que o N foi o nutriente com maior correlação com o crescimento das plantas, sendo estatisticamente distinto do P e do K (Figura 4). Adicionalmente, a MPAS foi significativamente correlacionada com o N proveniente da FBN sob a forma de ureídeos (Figura 5) e houve correlação altamente significativa entre o NTPA e o NTU ($r = 0,997$, $p < 0,001$). A escolha de correlação com o parâmetro de MPAS apresenta vantagens em relação ao rendimento de grãos, que está condicionado a características genéticas da planta, como resistência ao acamamento e número de vagens por haste, nem sempre relacionadas à qualidade do solo.

Tabela 3. Coeficientes⁽¹⁾ de correlação entre os parâmetros⁽²⁾ utilizados para avaliação da fixação biológica do N₂ no Ensaio 1, com soja convencional, em seis locais produtores, na safra 2002/2003. A soja foi coletada no estádio R2.

Parâmetros	Cél.log	NN	MNS	MPAS	NTPA	NU%	NTU	ENNT	ENNU	587	5019	5079	5080	s/reação
Cél. log	1,00													
NN	-0,12	1,00												
MNS	-0,05	0,91	1,00											
MPAS	0,45	0,18	-0,02	1,00										
NTPA	0,29	0,50	0,27	0,88	1,00									
NU%	0,09	0,07	-0,16	0,18	0,22	1,00								
NTU	0,30	0,45	0,18	0,81	0,94	0,55	1,00							
ENNT	0,08	0,65	-0,86	0,42	0,17	0,35	0,27	1,00						
ENNU	0,10	0,61	-0,84	0,41	0,19	0,47	0,32	0,99	1,00					
587	-0,55	0,40	0,54	-0,53	-0,35	-0,29	0,41	-0,61	-0,62	1,00				
5019	-0,15	0,48	0,65	-0,32	-0,26	-0,13	0,28	-0,68	-0,66	0,50	1,00			
5079	0,01	0,00	0,04	-0,01	-0,08	0,06	0,05	-0,03	-0,01	0,08	0,34	1,00		
5080	0,42	0,31	-0,50	0,59	0,38	0,24	0,42	0,69	0,69	0,62	0,41	0,07	1,00	
s/reação	0,16	0,15	0,28	0,01	0,15	0,01	0,12	-0,30	-0,29	0,04	0,10	0,31	0,26	1,00

⁽¹⁾ $r \geq 0,61$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,48$ para $p < 0,05$. ⁽²⁾Número de células de *Bradyrhizobium* (cél. log, log n^o de células por grama); número de nódulos por planta (NN); massa de nódulos secos (MNS, miligramas por planta); massa da parte aérea seca (MPAS, gramas por planta); N total na parte aérea (NTPA, miligramas por planta); percentual do N total como ureídeos (NU%); N total como ureídeos (NTU, miligramas por planta); eficiência dos nódulos considerando o N total (ENNT, miligramas de N por grama de nódulo) e o N na forma de ureídeos (ENNU, miligramas por grama de nódulo); ocupação dos nódulos pelas estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e nódulos sem reação (%).

Quando todas as áreas foram consideradas (84 médias por parâmetro), também foram verificadas correlações positivas e altamente significativas entre MPAS e CBM e entre MPAS e NBM (Figura 6), bem como entre NTPA e CBM ($r = 0,65$, $p < 0,001$) e entre NTPA e NBM ($r = 0,65$, $p < 0,001$), indicando a viabilidade de utilização dos parâmetros de biomassa microbiana como bioindicadores do crescimento da soja.

As limitações dos ensaios conduzidos sob condições de laboratório para o monitoramento ambiental já foram

amplamente discutidas (Eijsackers, 1985; Grossbard, 1985), e um passo importante, nesse sentido, foi a definição das avaliações em escala de campo (Farm Scale Evaluations, FSEs), que estabeleceu alguns critérios, metodologias e bases estatísticas (Perry et al., 2003). O volume especial da revista *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* (v.358, 2003) relata os resultados obtidos em FSEs na Grã-Bretanha, após três anos de cultivo com culturas transgênicas de beterraba (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), milho (*Zea mays* L.) e canola (*Brassica napus*). Tanto nos estudos de definição de FSEs como nesse volume especial, são apresentados resultados referentes à biota do solo, mas somente invertebrados (Firbank et al., 2003; Perry et al., 2003; Squire et al., 2003).

Um problema identificado nos ensaios da Grã-Bretanha, conduzidos com o desenho experimental em split-plot, com metade da área cultivada com a cultura geneticamente modificada e a outra metade com a cultura convencional, foi a constatação da necessidade de repetição em 60 a 75 locais, por cultura, para conseguir detectar diferenças de 50% entre os tratamentos (Champion et al., 2003; Perry et al., 2003; Squire et al., 2003). Ainda assim, os autores demonstraram que, pela análise histórica das áreas, o cultivo tradicional por um ou vários anos antes do início do ensaio já havia afetado grupos sensíveis, em 50%, ou mais, dificultando a interpretação de qualquer efeito

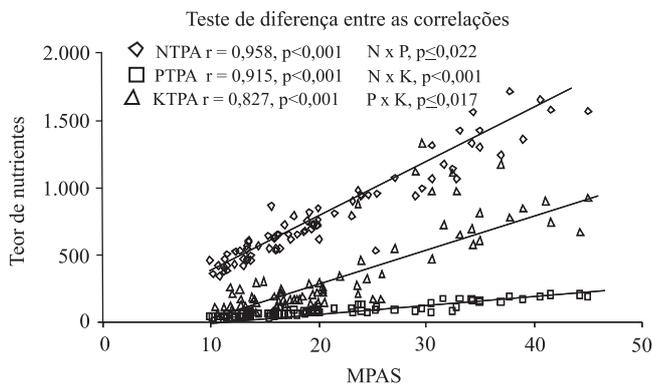


Figura 4. Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, gramas por planta) e o N total, P total e K total acumulados na parte aérea (NTPA, PTPA, KTPA, miligramas por planta) de soja cultivada em sete locais (Ensaio 2), com inoculação de *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Plantas coletadas no estádio R2.

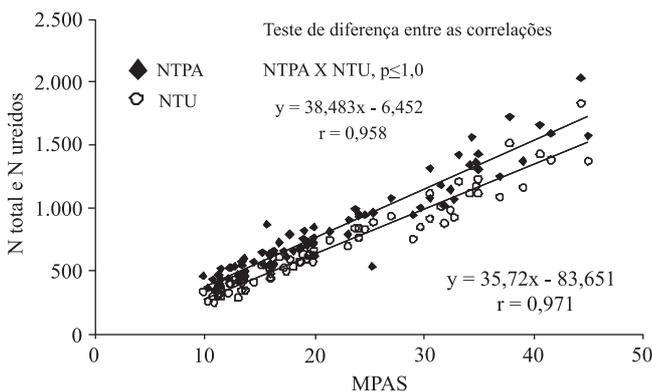


Figura 5. Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, gramas por planta) e o N total (NTPA) e N na forma de ureídios (NTPA, NTU, miligramas por planta) de soja cultivada em sete locais (Ensaio 2), com inoculação de *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Os valores de NTU não foram estimados para Brasília, pela falta de nodulação. Plantas coletadas no estádio R2.

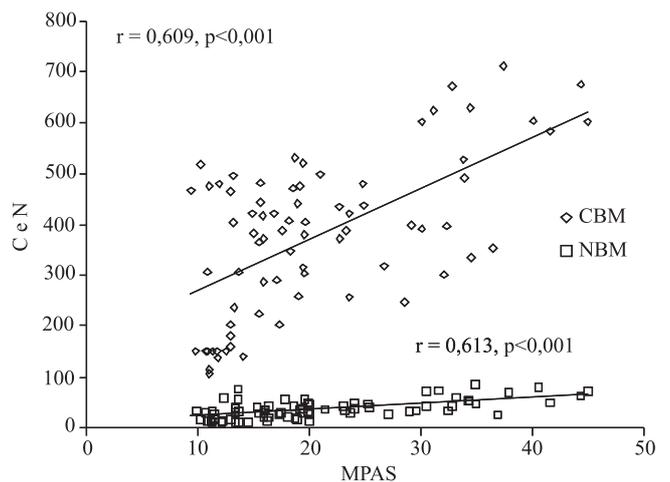


Figura 6. Correlação entre o C e o N da biomassa microbiana (BM) ($\mu\text{g g}^{-1}$) e a massa da parte aérea seca (MPAS, gramas por planta) de soja cultivada em sete locais (Ensaio 2). Avaliações realizadas no estádio R2.

positivo, ou negativo, do cultivo de plantas transgênicas (Squire et al., 2003). Souza et al. (2008) definem níveis aceitáveis de dispersão de alguns parâmetros biológicos para as condições edafoclimáticas do Brasil, pois, conforme salientado por Bruinsma et al. (2003), a falta de informação sobre o que deve ser uma variação normal ou modificada é, provavelmente, um dos principais fatores responsáveis pelo número elevado de estudos não conclusivos sobre impacto ambiental na microbiota do solo.

Em função das correlações obtidas, foi possível definir um conjunto mínimo de parâmetros para avaliar possíveis efeitos na microbiota do solo (CBM ou NBM e análise do DNA total do solo por DGGE) e na FBN (MNS, MPAS e, no caso de desconhecimento dos teores de N do solo, o NTPA ou NTU), pela adoção de novas tecnologias com a cultura da soja. A utilização desse conjunto mínimo de parâmetros, em diversos ensaios, pode promover a criação de bancos de dados, facilitar a identificação de problemas com a capacidade produtiva dos solos e permitir o monitoramento em avaliações de risco ambiental.

Conclusões

1. A avaliação do C ou do N da biomassa microbiana permite monitorar, quantitativamente, o impacto de novas tecnologias com a cultura da soja na microbiota do solo.

2. A análise do perfil de DNA total do solo por DGGE permite monitorar, qualitativamente, o impacto de novas tecnologias com a cultura da soja na microbiota do solo.

3. A massa de nódulos e da parte aérea secos, de plantas coletadas no estádio R2, constitui o conjunto mínimo de parâmetros para a avaliação da fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja, em solos com baixo teor de N.

4. Em solos com teores desconhecidos ou elevados de N, ou que receberam fertilizante nitrogenado, o conjunto mínimo de parâmetros para a avaliação da fixação biológica do nitrogênio deve incluir, ainda, o teor de N total ou de N de ureídios na parte aérea.

Referências

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.15-20, 2003.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob

diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.

BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.937-952, 1998.

BROOKES, G.; BARTFOOT, P. **GM crops: the first ten years global socio-economic and environmental impacts**. Ithaca: ISAAA, 2006. 96p. (ISAAA Briefs - Brief 36).

BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM crops: the global economic and environmental impact: the first nine years: 1996-2004. **AgBioForum**, v.8, p.187-196, 2005.

BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.837-842, 1985.

BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.37, p.329-337, 2003.

CHAMPION, G.T.; MAY, M.J.; BENNETT, S.; BROOKS, D.R.; CLARK, S.J.; DANIELS, R.E.; FIRBANK, L.G.; HAUGHTON, A.J.; HAWES, C.; HEARD, M.S.; PERRY, J.N.; RANDLE, Z.; ROSSALL, M.J.; ROTHERY, P.; SKELLERN, M.P.; SCOTT, R.J.; SQUIRE, G.R.; THOMAS, M.R. Crop management and agronomic context of the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.358, p.1801-1818, 2003.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966.

EIJSACKERS, H. Effects of glyphosate on the soil fauna. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.151-158.

FIRBANK, L.G.; HEARD, M.S.; WOIWOD, I.P.; HAWES, C.; HAUGHTON, A.J.; CHAMPION, G.T.; SCOTT, R.J.; HILL, M.O.; DEWAR, A.M.; SQUIRE, G.R.; MAY, M.J.; BROOKS, D.R.; BOHAN, D.A.; DANIELS, R.E.; OSBORNE, J.L.; ROY, D.B.; BLACK, H.I.J.; ROTHERY, P.; PERRY, J.N. An introduction to the farm-scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.2-16, 2003.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

GEPTS, P. Who owns biodiversity, and how should the owners be compensated? **Plant Physiology**, v.134, p.1295-1307, 2004.

GEPTS, P.; PAPA, R. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. **Environmental Biosafety Research**, v.2, p.89-103, 2003.

GROSSBARD, E. Effects of glyphosate on the microflora: with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D.

- (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.159-185.
- HAYDOCK, K.P.; NORRIS, D.O.; MANNETJE, L. t. The relation between nitrogen percent and dry weight of inoculated legumes. **Plant and Soil**, v.57, p.353-362, 1980.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. **Plant Physiology**, v.93, p.495-503, 1990.
- HUFFMAN, W.E.; ROUSU, M.; SHOGREN, J.F.; TEGENE, A. **Better dead than GM-fed?** Information and the effects of consumers' resistance to GM-foods in high-income countries. Ames: Iowa State University, 2003. 37p. Disponível em: http://www.econ.iastate.edu/research/webpapers/paper_10345_03017.pdf. Acesso em: 28 dez. 2005.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006. p.43-93.
- JENKINSON, D.S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. **European Journal of Soil Science**, v.17, p.280-302, 1966.
- MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.28-35, 2004.
- NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, 359-368, 1996.
- PERRY, J.N.; ROTHERY, P.; CLARK, S.J.; HEARD, M.S.; HAWES, C. Design, analysis and statistical power of the farm-scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.17-31, 2003.
- REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA. **Relato da IX reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola nos dias 16 a 18 de maio de 2000**. Disponível em: <http://www.relare.org.br/rtfatas/3077c4972fef320a47e17bff91c68dc.rtf>. Acesso em: 28 dez. 2005.
- SAS INSTITUTE. **Proprietary of software**: version 6. 4th ed. Cary: SAS Institute, 1999.
- SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CHUEIRE, L.M.O.; BARCELLOS, F.G.; CAMPO R.J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.71-82, 2008.
- SQUIRE, G.R.; BROOKS, D.R.; BOHAN, D.A.; CHAMPION, G.T.; DANIELS, R.E.; HAUGHTON, A.J.; HAWES, C.; HEARD, M.S.; HILL, M.O.; MAY, M.J.; OSBORNE, J.L.; PERRY, J.N.; ROY, D.B.; WOIWOD, I.P.; FIRBANK, L.G. On the rationale and interpretation of the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.358, p.1779-1799, 2003.
- UNIVERSITY OF AMSTERDAM. **The correlation coefficient**. Disponível em: <http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics.html>. Acesso em: 28 dez. 2005.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.
- WARDLE, D.A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**, v.67, p.321-358, 1992.
- WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global scale synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1627-1637, 1998.

Recebido em 26 de abril de 2007 e aprovado em 17 de dezembro de 2007