

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ANDERSON DE CARVALHO ROCHA

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO CICLO DO NITROGÊNIO EM AMOSTRAS DE SOLO  
SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E MATA NATIVA.

DOURADOS – MS

2021

ANDERON DE CARVALHO ROCHA

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO CICLO DO NITROGÊNIO EM AMOSTRAS DE SOLO  
SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E MATA NATIVA.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia, no curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

DOURADOS – MS

2021

ANDERON DE CARVALHO ROCHA

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO CICLO DO NITROGÊNIO EM AMOSTRAS DE SOLO  
SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E MATA NATIVA.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia, no curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira – Universidade Federal da Grande Dourados



---

Profª Drª Elaine Reis Pinheiro Lourente – Universidade Federal da Grande Dourados



---

Drª Fabiana Gomes da Silva Dantas – Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados. MS 2 de junho de 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R672d Rocha, Anderson De Carvalho  
DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO CICLO DO NITROGÊNIO EM AMOSTRAS DE  
SOLO SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E MATA NATIVA. [recurso eletrônico] /  
Anderson De Carvalho Rocha. -- 2021.  
Arquivo em formato pdf.  
  
Orientador: Rodrigo Matheus Pereira.  
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>  
  
1. Metagenômica. 2. Ecologia Microbiana. 3. WGS. I. Pereira, Rodrigo Matheus. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

*“Porquanto, nada podemos fazer contra a verdade,  
mas somente a favor dela.”*

*(2 Coríntio 13:8)*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus pelas oportunidades que tive na vida, de concluir mais uma etapa na minha vida com saúde ao longo dessa caminhada que foi a graduação que me rendeu conhecimentos valorosos.

Aos meus pais Antônio Carlos da Rocha Alves e Rosângela Gomes de Carvalho que me apoiaram nas minhas decisões e por me incentivarem a permanecer até o fim da graduação. Agradeço também aos colegas, amigos e professores que me acompanharam durante todo o processo e que me ajudaram a crescer como pessoa, aos quais me agregaram conhecimentos extra que levarei para toda a minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira que pacientemente me orientou durante a construção deste trabalho, sempre com disponibilidade para esclarecer dúvidas adicionando ainda mais conhecimentos aos quais me permitiram a conclusão deste trabalho.

Agradeço também aos colegas do grupo de estudo que através dos conhecimentos adquiridos em seus trabalhos colaboraram para enriquecimento e conclusão do meu TCC.

## RESUMO

O ciclo do nitrogênio é composto por sucessões de processos metabólicos realizados por diversas bactérias de vida livre e simbiote capazes de transformar o nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) em formas assimiláveis pelas plantas. A fixação biológica do nitrogênio é a principal responsável por suprir as necessidades de nitrogênio das plantas. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de bactérias do ciclo do nitrogênio de quatro amostras de solo com diferentes manejos agrícolas e uma amostra de solo de mata nativa, por meio de ferramentas de bioinformática para análise do DNA metagenômico total. As amostras de solo foram coletadas na região do município de Dourados (MS), na fazenda da Embrapa Agropecuária Oeste. Após a extração foi feito um sequenciamento total do DNA por meio da tecnologia de sequenciamento WGS (Whole Genome Shotgun) pela plataforma Illumina Hiseq 2500 gerando um total de 460.236 ORFs, os dados para análises de bioinformática utilizados neste trabalho foram obtidos em um trabalho anterior. Os dados obtidos pelo sequenciamento das amostras de solo foram exportados para a plataforma MG-Rast e foram feitas comparações contra o banco de dados Refseq, as sequências relativas a bactérias pertencentes ao ciclo do nitrogênio foram analisadas no programa STAMP. As análises foram feitas de alguns dos principais gêneros de bactérias presentes no ciclo do nitrogênio sendo eles os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Nitrobacter*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Com os resultados gerados pelo MG-Rast verificou-se a ocorrência de todas as bactérias analisadas em todas as amostras de solo, no total foram 43561 sequências de DNA encontradas sendo 2083 sequências referente ao gênero *Azorhizobium*, 17368 referente ao gênero *Bradyrhizobium*, 3050 referente ao gênero *Mesorhizobium*, 8616 referente ao gênero *Methylobacterium*, 5881 referente ao gênero *Nitrobacter*, 3480 referente ao gênero *Rhizobium* e 3079 referente ao gênero *Sinorhizobium*. Foram identificadas um total de 20 espécies de bactérias pertencentes aos gêneros analisados, a espécie *Bradyrhizobium japonicum* apareceu com maior proporção nas amostras analisadas. Foram identificadas 21 sequências referente a enzimas pertencentes ao ciclo do nitrogênio, esses resultados mostram que existe uma grande diversidade de bactérias do ciclo do nitrogênio em manejos agrícolas e mata nativa.

**Palavras chaves:** Metagenômica, Ecologia Microbiana, WGS.

## ABSTRACT

The nitrogen cycle is a cycle composed of successions of metabolic processes carried out by various bacteria of free-life and symbionte capable of transforming gaseous nitrogen (N<sub>2</sub>) into assimilable forms by plants. The biological fixation of nitrogen is the main responsible for meeting the nitrogen needs of the plants. This work aimed to evaluate the diversity of these bacteria belonging to the nitrogen cycle in four samples of soil under different agricultural management and sample of native forest soil, through bioinformatics tools for analysis of total metagenomic DNA. Solo samples were collected in the region of the Municipality of Dourados (MS), at EMBRAPA Agropecuária West farm, a total DNA sequencing was done through the WGS sequencing technology (WHOLE GENOME SHOTGUN) by the ILLUMINA HISEQ 2500 platform generating a total of 460.236 ORFs, data for bioinformatics analyzes used in this work were obtained in a previous job. The data obtained by the sequencing of soil samples were exported to the MG-RAST platform and comparisons were made with Refseq databases for and KO (KEGG Orthology), the resulting sequences were analyzed in the Stamp program. The analyzes were made from the main genres of bacteria present in the cycle of nitrogen being them the genres azorhizobium, bradyrhizobium, mesorhizobium, methylobacterium, nitrobacter, rhizobium and sinrhizobium. With the results generated by the MG-RAST, the occurrence of all the bacteria analyzed in all soil samples, in total were 43561 sequences found being 2083 sequences related to the gender *Azorhizobium*, 17368 referring to the genus *Bradyrhizobium*, 3050 referring to the genus *Mesorhizobium*, 8616 referring to the genus *Methylobacterium*, 5881 concerning the genus *Nitrobacter*, 3480 referring to the genus, *Rhizobium* and 3079 referring to the *Sinorhizobium* genus. A total of 20 species of bacteria belonging to the genera analyzed, the species *Bradyrhizobium japonicum* appeared with a greater proportion in the samples analyzed. We identified 21 sequences referring to enzymes belonging to the nitrogen cycle, these results show that there is a great diversity of nitrogen cycle bacteria in agricultural management and native forest.

**Keywords:** Metagenomic, Microbial Ecology, WGS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráfico de radar da relação sequências brutas por amostras de solo dos sete gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2. Gráfico de radar da relação sequências brutas por gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio nas amostras de solo.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 3. Gráfico de barras dos resultados com os valores das sequências normalizadas dos gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio encontrada em cada manejo de solo e mata nativa. .... 26
- Figura 4. Gráfico de radar da relação sequências brutas por espécies de bactérias dos sete gêneros do ciclo do nitrogênio nas amostras de solo.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 5. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra de mata nativa em relação ao manejo pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem contínua. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo plantio direto. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio direto. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Mata nativa; Azul claro: Integração lavoura pecuária. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Mata nativa; Azul claro: Plantio convencional. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 9. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo plantio direto. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Plantio direto.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 10. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Integração lavoura pecuária. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 11. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Plantio convencional. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 12. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo plantio direto em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Plantio direto; Azul claro: Integração lavoura pecuária. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 13. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo plantio direto em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Plantio direto; Azul claro: Plantio convencional. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 14. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo integração lavoura pecuária em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Integração lavoura pecuária; Azul claro: Plantio convencional. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 15. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper. Atividades enzimática de bactérias do gênero <i>Azorhizobium</i> . Azul: mata nativa; Vermelho: pastagem contínua; Laranja: plantio direto; Verde: integração lavoura pecuária; Roxo: plantio convencional .....	39
Figura 16. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper. Atividade enzimática de bactérias do gênero <i>Bradyrhizobium</i> . Azul: mata nativa, vermelho: pastagem contínua, laranja: plantio direto, verde: integração lavoura pecuária, roxo: plantio convencional. ....	40
Figura 17. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper. Atividade enzimática de bactérias do gênero <i>Methylobacterium</i> . Azul: mata nativa, vermelho: pastagem contínua, laranja: plantio direto, verde: integração lavoura pecuária, roxo: plantio convencional. ....	41
Figura 18. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper Atividade enzimática bactérias do gênero <i>Nitrobacter</i> . Azul: mata nativa, vermelho: pastagem contínua, laranja: plantio direto, verde: integração lavoura pecuária, roxo: plantio convencional. ....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências brutas gerados no MG-Rast pelo banco de dados Refseq com a quantidade de sequências de cada um dos sete gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio em cada amostra de solo. ....	23
Tabela 2. Resultados da quantidade de sequências brutas de espécies de bactérias dos sete gêneros analisados do ciclo do nitrogênio.....	27
Tabela 3. Código de enzima identificadas pelo Keep Mapper. ....	34

## LISTA DE ABREVIACÕES

Cr: Cromo

EC: Código da Enzima

EPS: Exopolissacarídeo

Fe: Ferro

FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio

INSDC: Colaboração Internacional de Dados de Sequência de Nucleotídeos

Mo: Molibdênio

NCR AMPs: Peptídeos antimicrobianos rico em cisteínas específico de nódulos

NF: Fator Nod alternativo

NiRs: Nitrito Redutoras Respiratórias

NOB: Bactérias Oxidantes de Nitrito

ORF: Open Read Frame

QS: Quorum Sensing

RPCP: Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

T3SS: Sistema de Secreção Bacteriana tipo III

T4SS: Sistema de Secreção Bacteriano tipo IV

V: Vanádio

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 Importância da fixação de nitrogênio .....	5
2.2. Alguns importantes gêneros de bactérias do ciclo de nitrogênio .....	8
2.2.1 <i>Azorhizobium</i> .....	8
2.2.2 <i>Bradyrhizobium</i> .....	9
2.2.3 <i>Mesorhizobium</i> .....	10
2.2.4 <i>Methylobacterium</i> .....	11
2.2.5 <i>Nitrobacter</i> .....	12
2.2.6 <i>Rhizobium</i> .....	12
2.2.7 <i>Sinorhizobium</i> .....	13
2.3. Metagenômica .....	14
2.4. Bioinformática .....	15
2.5. Manejos de solo .....	16
2.6. Inoculantes .....	17
3.0 OBJETIVO.....	19
3.1 Objetivos específicos .....	19
4. MATERIAL E METODOS .....	20
4.1. Amostragem dos solos e extração do DNA .....	20
4.2. Sequenciamento do DNA e Processamento das Sequências.....	21
4.3. Análises de Bioinformática .....	21
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Abundância.....	23
5.2. Análise estatística .....	28
5.3 Análise Funcional .....	33
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS: .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e conseqüentemente influencia na produtividade das grandes culturas de alimentos como a soja. A utilização de fertilizantes nitrogenados aumenta os custos das culturas de alimentos, além de provocar prejuízos ao meio ambiente. Nesse sentido, a fixação biológica de nitrogênio surge como uma alternativa, uma vez que esse processo consiste na redução do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em outras formas que são assimiláveis pelas plantas por meio de bactérias presentes no ambiente. Dessa maneira as culturas têm suas necessidades de nitrogênio supridas, bem como um desenvolvimento mais significativo e diminuição dos custos da produção (MUS et al., 2016).

A fixação biológica de nitrogênio é a forma mais eficiente de fixação de nitrogênio em termos de gasto energético e de benefícios para a agricultura quando comparado a outros métodos, por isso estudar essa relação da comunidade microbiológica proporciona mais disponibilidade de tecnologias para melhorar a produtividade para a agricultura (CHERKASOV et al., 2015). A redução do nitrogênio atmosférico é possível devido a produção de várias enzimas por bactérias dizotróficas que reduzem o nitrogênio em formas assimiláveis para as plantas (KIM et al., 1994).

O solo é um sistema composto por uma diversidade de comunidades microbiana imensa e complexa sendo difícil de determinar a sua composição. Para melhor entender as relações existentes da diversidade genética e a estrutura das comunidades microbianas tem sido empregadas técnicas para caracterização taxonômica e funcional do DNA extraídos do solo (NANNIPIERI et al., 2017). A metagenômica se tornou uma ferramenta muito importante nos estudos de comunidades microbianas, nos permitindo conhecer um mundo novo com grande potencial de impactar diversos setores da sociedade. Por meio das ferramentas de bioinformática novas descobertas têm sido relatadas como, novos genes, enzimas, funções bioquímicas e vias de moléculas bioativas (ALVES et al., 2018).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo analisar se ocorrem alterações nas populações de bactérias do ciclo do nitrogênio em amostras de solo com diferentes manejos agrícolas e mata nativa de Dourados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento químico muito importante para os seres vivos sendo um dos principais nutrientes para manutenção da vida. A atmosfera possui o maior estoque de nitrogênio sob a forma de  $N_2$ , no entanto a maioria dos organismos vivos necessitam de nitrogênio nas formas de amônio e nitrato para assimilação. Existe uma complexa rede de microrganismos capazes de transformar o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis para os outros seres vivos (KUYPERS et al., 2018).

Os microrganismos capazes de converter o  $N_2$  em amônia e nitrato são chamados de diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, e o processo de assimilação do nitrogênio é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FÁBIO et al., 2018). Cerca de 97% do N produzido nos ecossistemas naturais é devido a FBN e se considerarmos os sistemas naturais e agrícolas cerca de 65% do N total é produzido pela FBN. Devido à alta demanda de alimentos no mundo e a baixa disponibilidade de N para as culturas ocasionou o crescimento da utilização de fertilizantes nitrogenados provocando um aumento do fluxo de nitrogênio no ciclo terrestre (FÁBIO et al., 2018).

Os genes *nif* são os responsáveis pela síntese da nitrogenase, principal enzima no processo da FBN, e um outro grupo de genes acessórios conhecidos como *fix* são responsáveis pela regulação da nitrogenase. A expressão do gene *nif* é estimulada quando há disponibilidade de carbono e escassez de N no ambiente, pode ser inibida quando há presença de nitrato, amônio ou nitrogênio na forma de aminoácidos (FÁBIO et al., 2018). Por meio de estudos realizados sobre a nitrogenase determinou a existência de sistemas alternativos da nitrogenase, dividindo-se em nitrogenase 1 dependente de Molibdênio (Mo) e Ferro (Fe) sendo codificada pelo gene *nif*; nitrogenase 2, dependente de Vanádio (V) e codificada pelo gene *vnf* e nitrogenase 3, dependente de Ferro (Fe) e codificada por genes *anf*. (CASSETARI et al, 2016).

Além dos mecanismos citados existe um ainda mais evoluído, é o que ocorre entre rizóbios e leguminosas, dentro dos nódulos existe uma proteína chamada leg-hemoglobina que possui função semelhante a hemoglobina, sendo responsável por carregar o oxigênio para a respiração das bactérias intra-nodulares suprimindo a necessidade de energia para a redução do N-atmosférico em

amônio, dessa forma mantem o oxigênio na forma associada impedindo que o oxigênio danifique a nitrogenase. Os nódulos que possuem a leg-hemoglobina possuem uma cor avermelhada em seu interior diferenciando dos nódulos de cor branco ou esverdeado que não possuem essa proteína (CASSETARI et al., 2016).

### Ciclo do Nitrogênio

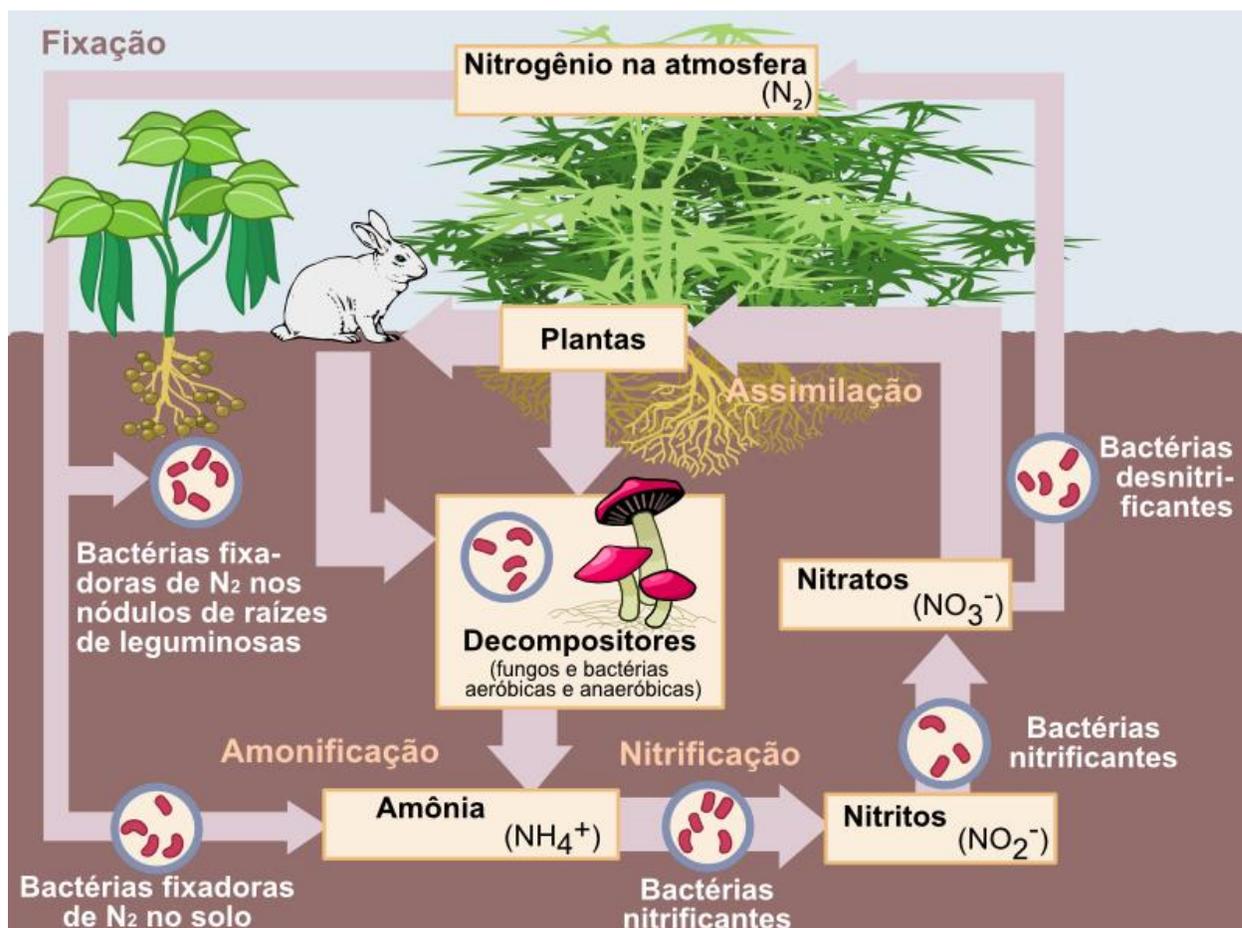


Figura 1. Processo de fixação e desnitrificação do nitrogênio.  
Fonte: Pedro Spoladore/Johann Dréo.

A FBN pode ocorrer por duas vias principais, a simbiótica e a de vida livre. A FBN simbiótica é a associação mutualística entre microrganismos diazotróficos e plantas, localizados nos nódulos formados nas raízes das plantas. Podem ser considerados FBN de vida livre bactérias epífitas, endofíticas, bactérias associadas a rizosfera das plantas ou não associadas as plantas (FÁBIO et al., 2018).

A associação de bactérias diazotróficas com as leguminosas formam estruturas especializadas nas raízes das plantas chamadas de nódulos, e é nessas estruturas que ocorre o processo de FBN. Nos nódulos, íons de hidrogênio são inseridas á amônia sintetizada, sendo transformada em amônio e distribuído para a planta sob diversas formas N (FÁBIO et al., 2018), essa relação simbiótica pode suprir as necessidades de N da planta (SANTOS et al., 2019). Para que ocorra a formação de nódulos nas leguminosas é necessária uma interação de reconhecimento específico entre a leguminosa e os rizóbios, através de mecanismos de sinalização e transdução de sinais moleculares (CASSETARI et al., 2016).

A redução do nitrato em óxido nitroso pelas NiRs (nitrito redutoras respiratórias) é uma etapa essencial na desnitrificação. Existe dois grupos de desnitrificadores os que possuem nitrito redutase expressa pelo gene *nirK* ou a nitrito redutase do citocromo *cd1* expresso pelo gene *nirS*. A bactéria oligotrófica *Bradyrhizobium oligotrophicum* S58 apresenta ambos os genes desnitrificadores *nirK* e *nirS* e outros genes que colaboram para a desnitrificação do nitrato em dinitrogênio (SÁNCHEZ et al., 2018).

A nitrogenase é muito sensível ao oxigênio e a interação entre eles causa danos irreversíveis a enzima, isso é um problema para os microrganismos diazotróficos que possuem metabolismo aeróbico, no entanto esses microsimbiontes desenvolveram mecanismos para contornar esse problema, como aumento da atividade respiratória, desenvolvimento preferencial em sítios microaerofílicos, produção de polissacarídeos extracelulares e formação de células especializadas (CASSETARI et al, 2016).

A FBN obtido pela interação de plantas e bactérias diazotróficas é o processo de maior destaque no processo de fixação de nitrogênio no ecossistema terrestre e na agricultura, pois além de fixar nitrogênio esses microrganismos geram outros benefícios como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP), produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas e também na solubilização de fosfatos. Assim ao inocular e maximizar a fixação biológica de nitrogênio, pode-se inclusive reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, pois utilização de fertilizantes nitrogenados é um dos principais fatores de poluição do solo e contaminação dos lençóis freáticos, ocasionando em perdas por volatilização e lixiviação, provocando prejuízos ao meio ambiente (CASSETARI; et al., 2016).

Ao optar por aplicação de fertilizantes nitrogenado para suprir as necessidades de nitrogênio da lavoura o agricultor irá precisar aplicar o equivalente a 550 kg/há de ureia, o preço médio do

adubo custo em torno de R\$ 1.200,00 com 43% de nitrogênio a aplicação custaria R\$ 636,00. A aplicação de inoculantes custaria para o agricultor R\$ 25,00/ha gerando economia de R\$ 611,00/ha além dos benefícios de não poluir o ambiente (DE CASTRO et al., 2019).

## **2.2. Alguns importantes gêneros de bactérias do ciclo de nitrogênio**

A fixação biológica do nitrogênio é de suma importância para obtenção desse nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, e a manutenção do ciclo do nitrogênio é de grande importância para culturas como a soja, pois é a leguminosa mais cultivada no mundo e possui grande impacto na economia dos países produtores dessa leguminosa. As principais espécies simbiotes da soja são o *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* podendo aumentar a produtividade em até 50%. (LEGETT et al., 2017).

É muito importante os estudos sobre a biodiversidade de microrganismos para aplicação agrícola, visando a melhoria do manejo de culturas através de populações microbiontes mais eficientes e mais adaptados aos diferentes tipos de solos (STRALIOTTO et al., 2006). As bactérias fixadoras de oxigênio mais conhecidas pertencem a ordem Rhizobiales, sendo os gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Ensifer), conhecidos como rizóbios (FÁBIO et al., 2018).

### **2.2.1 *Azorhizobium***

A classificação taxonômica de bactérias pertencentes a esse gênero é: Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Xanthobacteraceae, gênero: *Azorhizobium* (FEDERHEN et al., 2012).

As bactérias do gênero *Azorhizobium* são bastonetes Gram-negativo, possuem uma característica versátil de fixar nitrogênio quando em vida livre e quando em simbiose com *Sesbania rostrata*, podendo formar nódulos no sistema radicular e em radículas adventícias no caule (Lee et al., 2008; LANG et al., 2013), fornecendo nitrogênio a planta em troca de produtos da fotossíntese (CHOMA et al., 2012). A simbiose entre essas espécies também possui a capacidade de fazer transferência horizontal de genes para outros gêneros de rizóbios, sendo instensificada por flavonóides vegetais que também atuam com sinais para o início do processo simbiótico (LING et al., 2016).

Jiang et al. (2016) realizou um trabalho onde caracterizou um quimiorreceptor do *A. caulinodans* contendo a proteína IcpB, onde identificou essa proteína como sendo um regulador-chave da quimiotaxia e detecção de oxigênio no processo de simbiose com a *S. rostrata*.

A espécie *A. coulinodans* ORS571 possui um grupo de genes de quimiotaxia *che*, que coordena a formação de biofilmes EPS e a formação de nódulos competitiva (LIU et al., 2018).

Em um estudo realizado por Liu et al. (2020) constatou que o cálcio possui participação muito importante na formação de biofilmes além de estimular a colonização da raiz de *S. rostrata* por *Azorhizobium coulinodans*.

### **2.2.2 *Bradyrhizobium***

A classificação taxonômica de bactérias pertencentes a esse gênero é Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Bradyrhizobiaceae, gênero *Bradyrhizobium* (FEDERHEN et al., 2012).

A simbiose independente do fator Nod alternativo (NF) foi observada em algumas espécies de *Aeschynomene* noduladas por *Bradyrhizobium* fotossintéticos sem os genes nod ABC canônicos. Um estudo revelou que *Bradyrhizobium* não fotossintéticos também são capazes de formar nódulos em *Aeschynomene* independente de NF. Baseado nos dados do estudo indicam que dois processos independentes de NF ocorrem entre leguminosas e rizóbios, um dependente do sistema de secreção bacteriano tipo 3 (T3SS) e outro mecanismo até então desconhecido (OKAZAKI et al., 2016).

Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foram identificadas como RPCP (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) em manejo sob *Eucalyptus* sp e sobre mata nativa (PEREIRA et al., 2018).

Outro estudo testou a capacidade de redução de N<sub>2</sub>O e de fixação N<sub>2</sub> de cepas de *Bradyrhizobium* em nódulos de seis diferentes leguminosas. Como resultado foram identificadas várias cepas de *Bradyrhizobium* com capacidade de redução de N<sub>2</sub>O e também de fixação de N<sub>2</sub> que podem ser utilizadas para produção de inoculantes de leguminosas com capacidade de assimilação de ambos os compostos (WOLIY et al., 2019).

Em um estudo realizado por Moretti et al., (2019) foi avaliado os efeitos da inoculação de cepas de *Bradyrhizobium niponicum* e *Bradyrhizobium diazoefficiens* e metabólitos microbianos

secundários, onde constatou um aumento do desenvolvimento de cultivares de sojas e seu potencial como inoculantes para melhorar a produtividade da soja.

Chibera et al. (2017) com o objetivo de identificar cepas de rhizobio nativo com potencial para serem utilizadas na formulação de inoculantes em soja, isolou e identificou o rhizobio nativo através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Dos isolados que apresentaram capacidade de formar nódulos, 75% pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium* e 25% aos gêneros *Rhizobium*. As espécies que apresentaram melhores resultados foram as do gênero *Bradyrhizobium* sendo elas as *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *B. japonicum* possuindo uma excelente eficácia simbiótica sendo possível a inoculação para melhor produção da soja.

### **2.2.3 *Mesorhizobium***

A classificação taxonômica de bactérias pertencentes a esse gênero é Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Phyllobacteriaceae, gênero *Mesorhizobium* (FEDERHEN et al., 2012).

*Mesorhizobium* é um gênero de bactérias Gram-negativa, utiliza com fontes de nitrogênio, sais de amônio, nitratos e aminoácidos, possuem como característica a capacidade de hospedar nos pelos das raízes de uma grande variedade de leguminosas (CHEN et al., 2015).

Em um estudo realizou-se um mapeamento de associação em uma população de *Mesorhizobium* em solo serpentino observou uma especialização que apresenta diferenças genotípicas de adaptação dentro de uma população geneticamente semelhante, reforçando a ideia de que ambientes heterogêneos exige uma seleção onde ocorre uma alteração em uma mínima fração do genoma, e ainda propôs genes candidatos para adaptação do níquel que mostraram homologia a genes envolvidos na tolerância ao níquel (PORTER et al., 2017).

Em outro estudo 31 cepas isoladas de bactérias de nódulos da raiz de *Sophora* onde confirmou ser rizóbios típicos de *Sophora*, sendo essas bactérias pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* e das 31 cepas propôs 5 delas como novas espécies pertencentes ao gênero (MEYER et al., 2016).

Em um estudo foi realizado uma análise estrutural e funcional da proteína ACC desaminase de *Mesorhizobium* para determinar as propriedades físico-químicas através de ferramentas de bioinformática, a *Mesorhizobium loti* foi a espécie usada para representar o gênero *Mesorhizobium* para a modelagem da proteína ACC desaminase e também foi feita uma relação filogenética dos

genes *acdS* de diferentes cepas de *Mesorhizobium* com base na proteína ACC desaminase (PRAMANIK et al., 2017).

Um estudo com o objetivo de investigar a filogenia e expressão do gene *traG* conservado em *Mesorhizobium* que codifica um receptor de substrato T4SS que está relacionado com simbiose entre rizobia e leguminosas e também a ocorrência de genes dos complexos *tra/trb* e *virB/virD* também relacionados com a simbiose, onde constatou que na organização estrutural do T4SS os genes *virB/virD* estavam ausentes em todas as microssimbiontes de grão de bico e no simbionte de *M. Japonicum*, e também foi constatado a presença de genes pertencentes a outro substrato (T3SS) nas cepas sem os genes *virB/virD*. Foi observado a expressão do gene *traG* em *M. Mediterraneum Ca3* e *M. Ciceri LMS-1* nos exsudatos da raiz do grão de bico (PAÇO et al., 2019).

#### **2.2.4 *Methylobacterium***

A classificação taxonômica para bactérias pertencentes a esse gênero é Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Methylobacteriaceae, gênero *Methylobacterium* (FEDERHEN et al., 2012).

As bactérias desse gênero estão distribuídas nos mais diversos ambientes, possuem um metabolismo aeróbico, são Gram-negativas, formam colônias rosa a laranja avermelhadas, sendo capaz de crescer em meio com formaldeído, formato, metanol e aminas metiladas (GREEN et al., 2015).

Bactérias do gênero *Methylobacterium* possuem várias características podendo fixar nitrogênio, produzir fitohormônios, enzimas com pectinase e celulase, capaz de promover a resistência sistêmica na planta, e dependendo do hospedeiro ou pela presença de outros microrganismos podem apresentar-se como endófitos ou epífitas (DOURADO et al., 2010).

Esse gênero tem uma grande capacidade biotecnológica por ser capaz de formar simbiose com espécies de plantas produtoras de biocombustível como a *Jatropha curcas L.*, essa simbiose promove o aumento da tolerância ao baixo teor de nutrientes do solo além de suprir a necessidade de nitrogênio a partir da simbiose nas folhas (MADHAIYAN et al., 2015).

As *Methylobacterium* são capazes de obter carbono tanto por meio da fotossíntese da planta hospedeira quanto da metiltrofia, em associação com a espécie *Crotalaria podocarpa DC.* pode apresentar características incomuns como armazenamento de amido nas células da zona de fixação

e lise de tecidos nodulares apicais, onde ocorre a expressão de metiltrofia pelas bactérias de vida livre (RENIER et al., 2011).

### **2.2.5 *Nitrobacter***

A classificação taxonômica de bactérias pertencentes a esse gênero é Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Bradyrhizobiaceae, gênero *Nitrobacter* (FEDERHEN et al., 2012).

O gênero *Nitrobacter* são bactérias Gram negativa muito importantes no processo de FBN (SPIECK et al., 2015), atuando na etapa de oxidação aeróbica da amônia em nitrato via nitrito, sendo conhecidas como bactérias oxidantes de nitrito (NOB) (MELLBYE et al., 2016; HAN et al., 2018).

Um trabalho avaliou a respostas dos oxidantes de nitrito a diferentes tratamentos de fertilização química e orgânica em zonas agrícolas em amostras de solo vermelho, por meio dos dados obtidos acredita-se que o processo de oxidação do nitrito no solo vermelho é realizado por Nitrospira e Nitrobacter-loke NOB (HAN et al., 2018).

O quorum sensing (QS) influencia na etapa de nitrificação, por meio de extinção do QS da bactéria *Nitrobacter winogradskyi* observou-se que o quorum sensing influencia tanto na produção quanto no consumo de gases de óxido de nitrogênio que são tóxicos ao meio ambiente (MELLBYE et al., 2016).

### **2.2.6 *Rhizobium***

A classificação taxômica de bactérias pertencentes a esse gênero é: Filo: Proteobactéria, classe: Alphaproteobactéria, ordem: Hyphomicrobiales, família: Rhizobiaceae, gênero: *Rhizobium* (FEDERHEN et al., 2012).

Esse gênero é constituído por bactérias Gram-negativas, capaz de tolerar alta concentração de sal, cresce em pH variando entre 3,5 a 9,0 e temperatura de 42 °C, também capaz de produzir polissacarídeos extracelulares e sintetizar melanina (KÜÇÜK et al., 2006).

Em um trabalho realizado por Oliveira et al. (2018) onde avaliou a inoculação líquida de bactérias da espécie *Rhizobium etli* como potencial inoculantes de *Phaseolus vulgaris* (feijão

comum), pode observar que esse método de aplicação possui mais vantagens visto o custo benefício e a facilidade de aplicação em comparação com outros métodos tradicionais.

O *R. tropici* em 1991, foi a primeira espécie de rizóbio a ser descrita por meio de análise da sequência do gene 16s rRNA, devido algumas diferenças nas cepas de *R. tropici* foram divididos em dois subgrupos sendo tipo A e B. Um estudo de análise de sequência multilocus e caracterização fenotípica e genotípica incluindo hibridização do DNA-DNA propôs uma reclassificação do *R. tropici* tipo A como uma nova espécie chamada *Rhizbium leucaenae* sp. (RIBEIRO et al., 2012).

A espécie *R. tropici* como rizobactéria promotora de crescimento em plantas (RPCP) possui capacidade de aliviar o estresse salino quando inoculado em cultivo de milho, mostrando ser uma alternativa para combater esse tipo de estresse abiótico (FUKAMI et al., 2018).

A espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* simbiote de *Trifolium* (Trevo) possuem um segundo fator de nodulação o nodD2, suas funções aumentam a competição e a simbiose efetiva favorecendo seus hospedeiros perenes (FERGUNSON et al., 2020).

Em um estudo foi avaliado a variação da produção de exopolissacarídeo (EPS) por *Rhizobium tropici* em diferentes condições cultivos, concluindo que as variações ambientais e a relação carbono/nitrogênio influenciam no crescimento celular e produção de EPS (STAUDT et al., 2012).

### **2.2.7 Sinorhizobium**

A classificação taxonômica de bactérias pertencentes a esse gênero é Filo Proteobactéria, classe Alphaproteobactéria, ordem Hyphomicrobiales, família Rhizobiaceae, gênero: *Sinorhizobium* (FEDERHEN et al., 2012).

O *Sinorhizobium* é um gênero de bactérias fixadoras de nitrogênio, é um microssimbionte fixador de nitrogênio de uma grande variedade de hospedeiros (LÓPEZ-BAENA et al., 2016) e de várias espécies de Medicago (REEVE et al., 2010). Por apresentar uma grande capacidade de adaptação simbiótica com importantes culturas como a soja e o feijão estudos sobre essa característica é muito interessante (LÓPEZ-BAENA et al., 2016).

O gene Rfg1 da soja demonstrou ser responsável por inibir o processo de nodulação de várias cepas de *Sinorhizobium fredii*, resultados demonstrados através de testes por complementação e nocautes genéticos utilizando CRISPR/Cas9 (FAN et al., 2017).

O gene *nifH* de bactérias endofíticas do gênero *Sinorhizobium* de raízes de plantas de arroz podem melhorar a biossíntese de auxina da planta, aumentando significativamente a produção de auxina e também influencia na atividade da enzima nitrogenase afetando-a positivamente (DEFEZ et al., 2017).

Um trabalho desenvolveu protocolos para *Sinorhizobium meliloti* como vetor para transferência de DNA para *E. coli*, *S. cerevisiae* e *Phaeodactylum tricornutum*, os resultados demonstraram que sua utilização como vetor será de grande importância para pesquisas e aplicações biotecnológicas (BRUMWELL et al., 2019).

A espécie *Sinorhizobium sp SAR1* obtida de *Sesbania sesban* demonstrou resistência ao cromo (Cr) além de capacidade de reduzir para formas menos tóxicas, em um estudo sobre biorremediação do cromo.

A proteína bacteriana BacA é essencial para estabelecer a simbiose do *Sinorhizobium meliloti* com a leguminosa *Medicago truncatula*, pois garante proteção contra peptídeos antimicrobianos ricos em cisteínas específicos de nódulos (NCR AMPs) produzidas pela leguminosa (HAAG et al., 2011).

### 2.3. Metagenômica

As análises metagenômicas são realizadas para analisar uma grande comunidade microbiana diretamente do ambiente sem a necessidade de cultivar ou isolar o microrganismo. A metagenômica permite identificar e caracterizar espécies presentes na microbiota gerando informações como atividade metabólica e funções funcionais (GHOSH et al., 2019).

Os sequenciadores da plataforma Illumina são amplamente utilizados pela capacidade de leitura simultânea de centenas de milhões de sequências por meio de química de terminador reversível de corante fluorescente. Certos procedimentos têm grande impacto na qualidade do sequenciamento tais como qualidade da biblioteca de sequenciamento, o manuseio da amostra, as configurações do instrumento e a química do sequenciamento (KIRCHER et al., 2011).

A análise metagenômica WGS (Whole Genome Shotgun) é utilizado quando é necessário sequenciar o material genético total de uma amostra complexa, dessa maneira permitindo um melhor conhecimento da diversidade e abundância das espécies, rotas metabólicas e reconstrução de sequências do genoma (GHOSH et al., 2019).

O sequenciamento 16S é uma técnica de sequenciamento da região do gene 16S rRNA bacteriano permitindo fazer análises taxonômicas de uma comunidade podendo ser usado também para análise de diversidade microbiana. Um problema dessa técnica a possibilidade de dois organismos diferentes serem identificados como sendo o mesmo se tiverem a mesma sequência do gene 16S rRNA (GHOSH et al., 2019).

## **2.4. Bioinformática**

A Bioinformática é uma área multidisciplinar, na qual utiliza-se de computadores para armazenar, analisar e interpretar muitos dados biológicos por meio de várias ferramentas que podem ser aplicadas, como anotação do genoma, análise de expressão gênica, genômica comparativa, predição de proteínas, análise de sequência (importante para descobrir evoluções genéticas de vários organismos) (GUPTA et al., 2017).

O surgimento da Bioinformática teve início com o sequenciamento do DNA após a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 e diversos trabalhos sobre a estrutura proteica na década de 1960 (GAUTHIER et al., 2019). Margaret O. Dayhoff pioneira no campo da bioinformática contribuiu no desenvolvimento de computadores capazes de identificar sequências peptídicas e softwares além de outros métodos computacionais sendo uma das mais importantes pesquisadoras da bioinformática (GAUTHIER et al., 2019).

O MG-Rast é um sistema de análise de dados de sequência de metagenoma público, o usuário pode fazer o depósito de seus dados de sequências no formato fasta, essas sequências são normalizadas e analisadas gerando resumos automaticamente (MEYER et. al, 2008). O servidor oferece várias ferramentas para analisar diferentes tipos de dados, como construção filogenética e metabólica e a capacidade de comparar o metabolismo e as anotações de um ou mais metagenomas e genomas (MEYER 2008). Para utilizar os serviços disponíveis no MG-Rast é necessário ter acesso do usuário, uma forma de garantir a privacidade dos dados permitindo ter controle sobre o compartilhamento dos dados entre os vários usuários do MG-Rast (MEYER at. al, 2008).

O Refseq é um dos bancos de dados biológicos que possui dados públicos curados de anotação genômica, transcritos e sequências de proteínas. Os dados são retirados da Colaboração Internacional de Dados de Sequência de Nucleotídeos (INSDC) e passam por uma análise

comparativa de todos os genomas em um clado, combinação de computação, curadoria manual e produção de padrão de sequências de referência estáveis e não redundantes sendo um rigoroso processo de controle de qualidade, sendo descartados aqueles genomas que não possuem os padrões necessários. Os dados encontrados no Refseq aumentam à medida que novas publicações, recursos funcionais e nomenclatura informativa são adicionados (BRISTER et al., 2015) (TATUSOVA et al., 2016).

O Kegg é um recurso de banco de dados integrados com 18 bancos de dados sobre informações de sistemas, genômicas, químicas e de saúde. No Kegg Orthology (KO) ficam armazenadas as informações das funções moleculares de genes e proteínas associadas a grupos ortólogos. Também possui a ferramenta de mapeamento Kegg que gera um conjunto de dados moleculares, por meio de reconstrução de sistemas de redes moleculares com base em ortólogos funcionais. Os mapas são gerados por meio de redes do banco de dados do Kegg Orthology (KANEHISA et al., 2016; KANEHISA et al., 2021).

O Kegg Mapper utiliza-se de um conjunto de ferramentas para mapeamento metabólico KEGG, BRITE e MODULE. Possui cinco ferramentas no total, sendo três para mapeamento de várias operações simultâneas, “Reconstruct Pathway”, “Search Pathway” e “Seach&Color Pathway” as outras duas ferramentas “Color Pathway” e “Join Brite” são para mapear um único caminho ou um único arquivo de hierarquia (KANEHISA et al., 2020).

## 2.5. Manejos de solo

A Mata Nativa caracteriza-se por ser uma floresta virgem que nunca sofreu interferência ou exploração humana, apresentando uma grande diversidade biológica no seu ecossistema. A floresta estacional semidecidual típica dos biomas de Mata Atlântica e Cerrado sofrem influência de períodos climáticos secos e chuvosos (WHITE et al., 1994).

O manejo de Pastagem Contínua ou PASTEJO CONTÍNUO caracteriza-se pela permanência dos animais em uma determinada área durante o ano inteiro. Normalmente esse tipo de manejo é utilizado quando a pastagem é nativa (VIEIRA et al., 1997). Já o manejo de Plantio Direto caracteriza-se pelo plantio sem a realização das etapas tradicionais de aração e gradagem do solo, onde é necessário que o solo esteja coberto por vegetação em desenvolvimento e resíduos vegetais (CRUZ et al., 2007).

O sistema Integração Lavoura Pecuária caracteriza-se por um sistema de produção no qual há a integração de culturas anuais e pecuária em um mesmo local de forma de consórcio, sucessão ou rotação tendo como objetivo maximizar a combinação ente a pecuária e a lavoura (BENDAHAN et al., 2017).

O Plantio Convencional caracteriza-se pela combinação da aração e gradagens, sendo a aração do solo a parte mais grosseira que tem como objetivo afrouxar o solo, sendo também utilizada para implementação de correção, de fertilizantes, de resíduos vegetais, ou para descompactação superficial (CRUZ et al., 2007).

## 2.6. Inoculantes

Inoculantes são produtos compostos por microrganismos vivos, geralmente bactérias, que favorecem o desenvolvimento de diferentes espécies de vegetais (SANTOS et al., 2019). As bactérias diazotróficas são as que vem sendo utilizadas a mais tempo como inoculantes de diversas plantas da família Fabaceae (SANTOS et al., 2019).

Os inoculantes são produtos que possuem uma grande quantidade de bactérias que possuem especificidade e são muito benéficas para às lavouras. A sua aplicação resulta em aumento da fixação biológica de nitrogênio e induz a redução da utilização de fertilizantes químicos nitrogenados. No mercado pode-se encontrar inoculantes líquidos, géis e turfosos (HUNGRIA et al., 2007).

Segundo a Associação Nacional do Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), até 2017 eram comercializados anualmente cerca de 40 milhões de doses de inoculantes no Brasil, sendo 34 milhões de doses para a cultura da soja e restante para outras culturas (FERREIRA et al., 2017).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são utilizadas para produção de inoculantes que, quando em associação simbiótica com as raízes das culturas de soja promovem a formação de nódulos, ocasionando na maior disponibilidade de nitrogênio para o desenvolvimento da planta (HUNGRIA et al., 2007).

Uma nova técnica de inoculação que vem sendo usada nas culturas de soja e feijão é conhecida como coinoculação. Essa técnica consiste em adicionar mais de um microrganismo benéfico para a cultura para maximizar a produtividade. Tem sido utilizado a combinação de

*Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasiliense*, que tem gerado um aumento médio da produtividade da soja em 16% (HUNGRIA et al., 2014).

A soja é uma das culturas que mais se destaca quando se trata da utilização de inoculantes, tendo como inoculo cepas de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (SANTOS et al., 2019). Os EUA, Brasil e Argentina são os maiores produtores de soja no mundo, sendo Brasil e Argentina os maiores destaques de sucesso quanto a utilização de inoculantes no cultivo da soja (SANTOS et al., 2019).

O feijão comum é uma cultura muito importante e consumida em vários países do mundo, principalmente na América Latina e na África (SANTOS et al., 2019). Cepas do gênero *Rhizobium* são utilizadas como inoculantes nas culturas de feijão no Brasil, estudo realizados com cepas de *R. tropici* mostraram altas taxas de FBN (SANTOS et al., 2019).

O feijão-caupi é bastante cultivado no Norte e Nordeste do Brasil devido suas características de alta tolerância as condições climáticas dessas regiões, tendo como limitante de seu desenvolvimento o N, testes realizados em países africanos com inoculo de cepas de *Bradyrhizobium* do Brasil em condições climáticas semelhantes as regiões Norte e Nordeste, tiveram resultados positivo aumentando a nodulação e produtividade do feijão-caupi (SANTOS et al., 2019).

### **3.0 OBJETIVO**

Analisar se ocorrem alterações nas populações de bactérias do ciclo do nitrogênio nas amostras de solo de Dourados sob diferentes manejos agrícolas e mata nativa.

#### **3.1 Objetivos específicos**

Identificar taxonomicamente os gêneros das bactérias do ciclo do nitrogênio em cada amostra de solo;

Identificar taxonomicamente quando for possível as espécies de bactérias do ciclo do nitrogênio.

Analisar funcionalmente quais enzimas que participam do ciclo do nitrogênio estão presentes em cada amostra de solo.

## 4. MATERIAL E METODOS

### 4.1. Amostragem dos solos e extração do DNA

As amostras de solo dos cinco manejos foram coletadas na Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) localizado no município de Dourados-MS (22°14' e 54°49' W), sendo estes caracterizados como Mata Nativa - MN (22°28'2231''S 54°81'4571''W); Plantio Direto – PD (22°16'53.9''S 54°48'21.2''W); Integração Lavoura Pecuária – PI (22°16'56.0''S 54°48'15.8''W); Plantio Convencional – PC (22°16'53.0''S 54°48'24.7''W) e Pastagem Contínua – PA (22°16'57.8''S 54°48'11.5''W). Todos os solos foram classificados desde a implantação como latossolo vermelho distroférico típico, cuja textura é argilosa.

O solo de MN é identificado pela floresta estacional semidecidual tendo dois períodos climáticos, sendo eles a chuva e a seca. O solo de PA é constituído de pastagem permanente com *Brachiaria decumbens*, estabelecido em uma área de aproximadamente 10 ha. No solo de PD existe um sistema de rotação de culturas, onde durante o verão é cultivado soja e aveia, trigo e nabo durante o inverno. O solo de PI possui pastagens relativas a área de pecuária e tem histórico de plantio de *Brachiaria decumbens* e ciclos de dois anos relativos à soja e aveia-preta. Já no solo de PC é cultivado regularmente com soja no verão, e com aveia no outono/inverno.

A amostragem foi realizada com uma profundidade de 0 a 10 centímetros da superfície, contendo 10 amostras simples para a obtenção de uma amostra composta que fosse representante de cada área amostrada.

As amostras de solo dos manejos foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração adequada e transportadas para a *Facility* do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA e Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal (LMSEQ) para realizar o sequenciamento genético.

A extração do DNA foi realizada utilizando o DNA SPIN KIT (MOBIO LABORATORIES), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a quantidade e qualidade do DNA foram determinadas por meio de espectrofotometria UV-Vis NanoDrop e fluorimetria Qubit.

A Relação 260/280 foi analisado no Nanodrop, apresentando os seguintes resultados: Amostra 1 - 126,10 ng/uL 1,90 (260/280), Amostra 2 - 103,90 ng/uL 1,80 (260/280), Amostra 3 -

100,50 ng/uL 1,73 (260/280), Amostra 4 - 51,0 ng/uL 1,84 (260/280), Amostra 5 - 28,5 ng/uL 1,95 (260/280).

## **4.2. Sequenciamento do DNA e Processamento das Sequências**

O sequenciamento do DNA foi realizado através da tecnologia Illumina, utilizando o sequenciador HiSeq 2500. A qualidade do sequenciamento foi aferida utilizando o programa FastQC. Posteriormente foi feita uma filtragem das sequências menores do que 50 nucleotídeos ou de baixa qualidade, ou seja, com qualidade phred inferior a 20, através do programa Printseq-lite (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). A montagem das sequências (assembly) foi realizada através do programa IDBA-UD (PENG et al., 2012). A identificação de possíveis regiões codificantes, também conhecida como ORFs (open reads frames), foi realizada através do programa FragGeneScan (RHO; TANG; YE, 2010).

## **4.3. Análises de Bioinformática**

As análises de bioinformática foram realizadas na plataforma MG-Rast onde foi criado um login de acesso, em seguida as orfs dos quatro manejos agrícolas e da mata nativa foram disponibilizadas pelo Professor Rodrigo Matheus Pereira por meio de seu login de acesso na plataforma. Com as orfs disponíveis foram feitas as comparações dos manejos agrícolas e mata nativa contra os bancos de dados Refseq (MEYER et al., 2008).

Com os resultados brutos gerados na comparação com banco de dados Refseq na plataforma do MG-Rast foram ajustadas a visualização dos dados para análise de abundância no formato tabelado a nível de gênero e então anotados em uma tabela no Excel, depois a nível de espécie e anotados em uma outra tabela no Excel. Por meio de uma função no MG-Rast os dados brutos passaram por um ajuste estatístico de normalização e em seguida foram anotados em uma tabela no Excel (MEYER et al., 2008). No Excel com a tabela dos dados brutos foi feito dois gráficos de radar a nível de gênero um com uma relação sequências brutas/amostras de solo e outro de sequências brutas/gêneros, e um gráfico a nível de espécie com uma relação sequências brutas/amostras de solo. No Excel com a tabela dos resultados normalizados foi feito um gráfico de barras com a relação total de sequências normalizadas/amostras de solo.

Com os resultados obtidos no MG-Rast também foram realizadas análises estatísticas no programa STAMP. As análises foram feitas par a par entre duas amostras pelo teste estatístico G-test (w/Yates') + Fisher's com probabilidade de 95% (PARKS et. al, 2014).

Com os resultados gerados pelo banco de dados Refseq foram feitas as análises funcionais no MG-Rast na aba pluing na ferramenta KEGGmap, no qual faz uma comparação com o banco de dados KO (KEGG ORTHOLOGY) por meio da ferramenta Kegg Mapper gerando um mapa metabólico com várias opções de ciclo metabólico, em seguida na opção "maps with hits" foi selecionado o ciclo do nitrogênio gerando um mapa metabólico com o EC (código da enzima) referente a enzima que apresentou atividade na amostra.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Abundância

Foram geradas pelo sequenciamento um total de 460236 ORFs das amostras de solo e mata nativa, na comparação com o banco de dados Refseq retornaram um total de 43561 seqüências de DNA referente a bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio distribuídas nas amostras de solo e mata nativa.

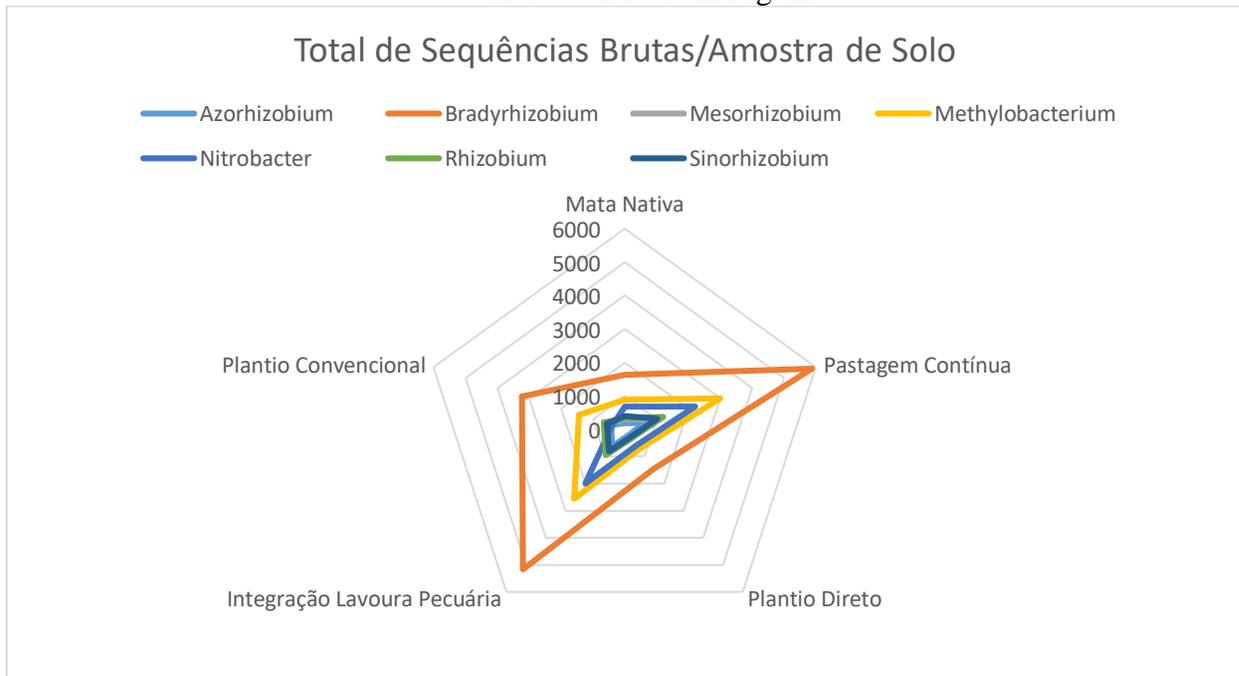
Tabela 1. Sequências brutas gerados no MG-Rast pelo banco de dados Refseq com a quantidade de seqüências de cada um dos sete gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio em cada amostra de solo.

Gênero	Mata Nativa	Pastagem Contínua	Plantio Direto	Integração Lavoura Pecuária	Plantio Convencional
<i>Azorhizobium</i>	189	625	220	628	421
<i>Bradyrhizobium</i>	1636	5878	1465	5167	3222
<i>Mesorhizobium</i>	296	1016	329	874	539
<i>Methylobacterium</i>	899	3000	724	2563	1430
<i>Nitrobacter</i>	679	2213	598	2000	391
<i>Rhizobium</i>	345	1209	324	949	653
<i>Sinorhizobium</i>	400	1022	295	811	551

A tabela 1 mostra a quantidade de seqüências geradas pela comparação dos dados das seqüências das amostras de solo contra o banco de dados do Refseq, dessa comparação foram geradas 43561 seqüências de DNA dos gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio presentes nas amostras de solo. O gênero *Bradyrhizobium* foi o que mais retornou números de seqüências com um total de 17368, o gênero *Methylobacterium* retornou um total de 8616 seqüências, o gênero *Nitrobacter* retornou um total de 5881 seqüências, o gênero *Rhizobium* retornou um total de 3480 seqüências, os gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* retornaram quantidades muito próximas de seqüências 3079 e 3054 e o gênero *Azorhizobium* retornou a menor quantidade de seqüências sendo 2083 no total. Já o número de seqüências em cada manejo de solo e mata nativa, o manejo

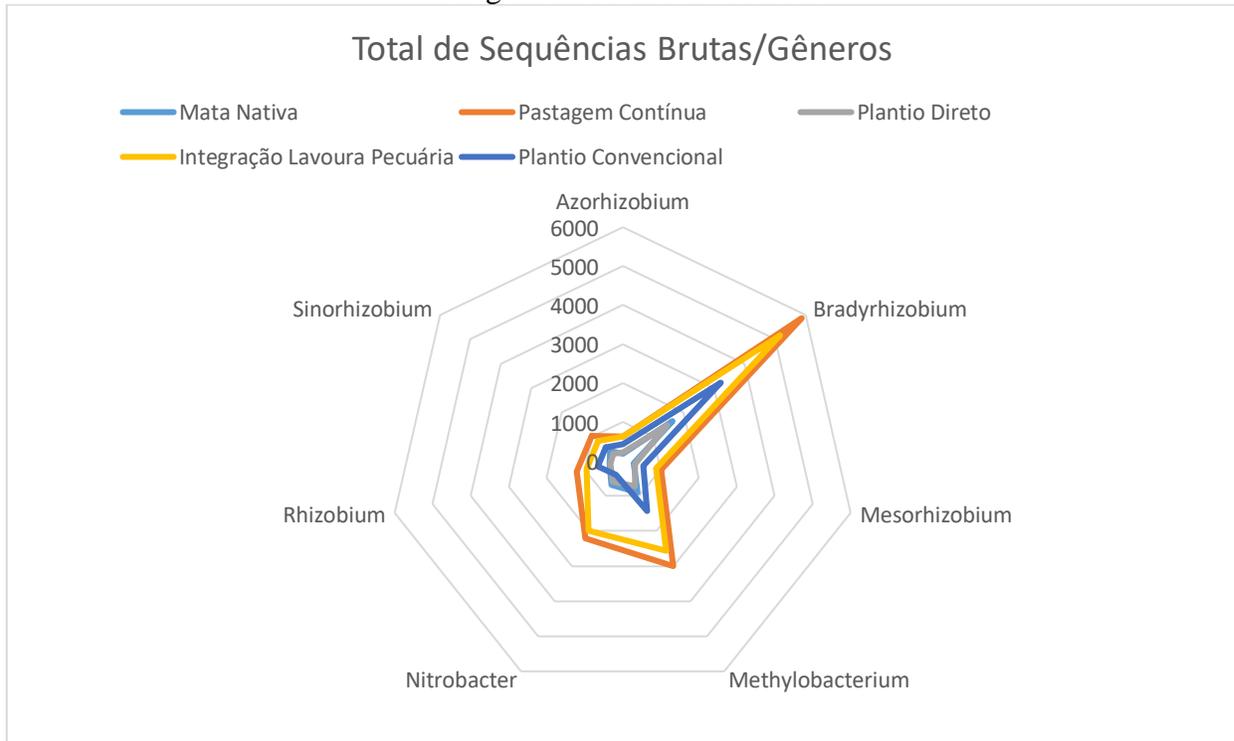
pastagem contínua retornou a maior quantidade de sequências 14963 no total, o manejo integração lavoura pecuária retornou um total de 12992 de sequências, o manejo plantio convencional retornou um total de 7207 de sequências, mata nativa retornou um total de 4444 de sequências e o manejo plantio direto retornou um total de 3955 de sequências.

Figura 2. Gráfico de radar da relação sequências brutas por amostras de solo dos sete gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio.



A figura 1 mostra o gráfico de radar das sequências brutas por amostra de solo tendo uma observação bidimensional das amostras de solo, pode-se observar que as pontas do radar de cada gênero tendem para os manejos pastagem contínua, integração lavoura pecuária e plantio convencional exceto pelo gênero *Nitrobacter* onde uma das pontas tende mais para a amostra de mata nativa do que o manejo plantio convencional.

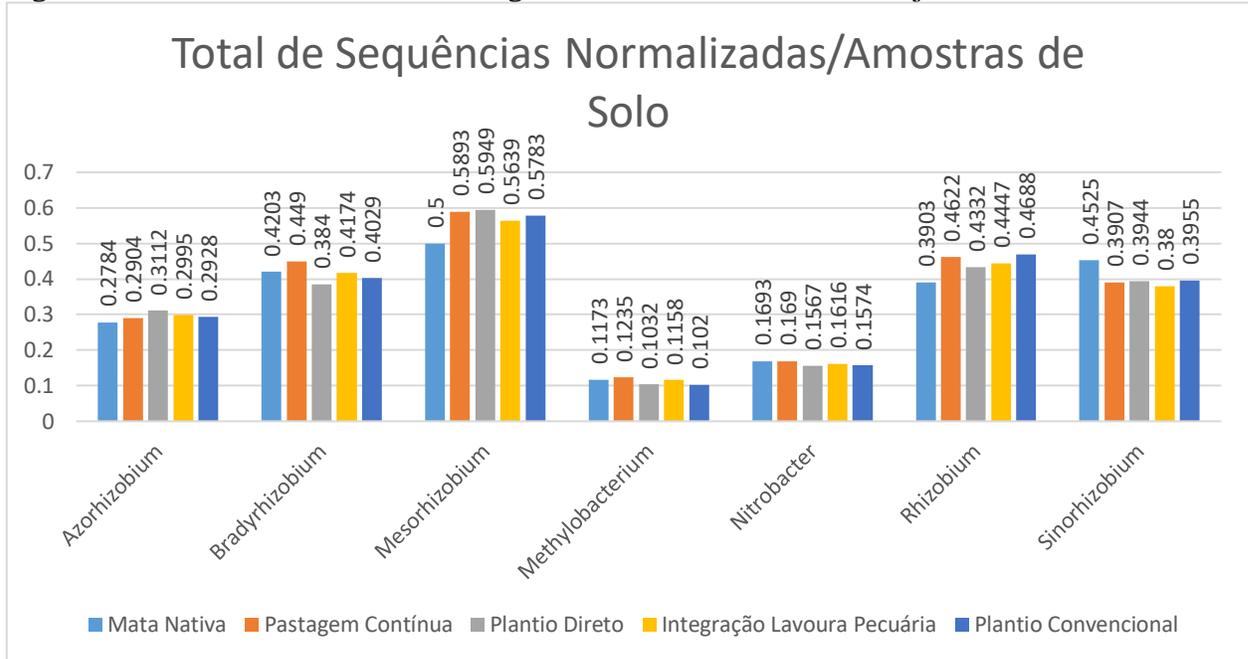
Figura 3. Gráfico de radar da relação sequências brutas por gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio nas amostras de solo.



A figura 2 mostra o gráfico de radar das sequências brutas por gênero de bactérias tendo uma visão bidimensional das sequências dos gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio, observa-se que as pontas do radar das amostras de solo tendem para o gênero *Bradyrhizobium*, e uma pequena tendência das pontas das amostras pastagem contínua e integração lavoura pecuária para o gênero *Methylobacterium*.

Na figura 3 os dados dos resultados brutos foram normalizados para evitar que os dados sejam tendenciosos para as variáveis de maior valor, colocando as variáveis em uma escala de 0 a 1, a maneira como foi disposto os dados na normalização é para poder fazer uma comparação precisa dos dados das sequências entre os diferentes tipos de manejos.

Figura 4. Gráfico de barras dos resultados com os valores das sequências normalizadas dos gêneros de bactérias do ciclo do nitrogênio encontrada em cada manejo de solo e mata nativa.



Com os resultados normalizados das sequências de bactérias, o gênero que apresentou maior proporção de sequências entre todas as amostras de solo foi o gênero *Mesorhizobium*, exibindo proporções maiores que os demais gêneros (Figura 3).

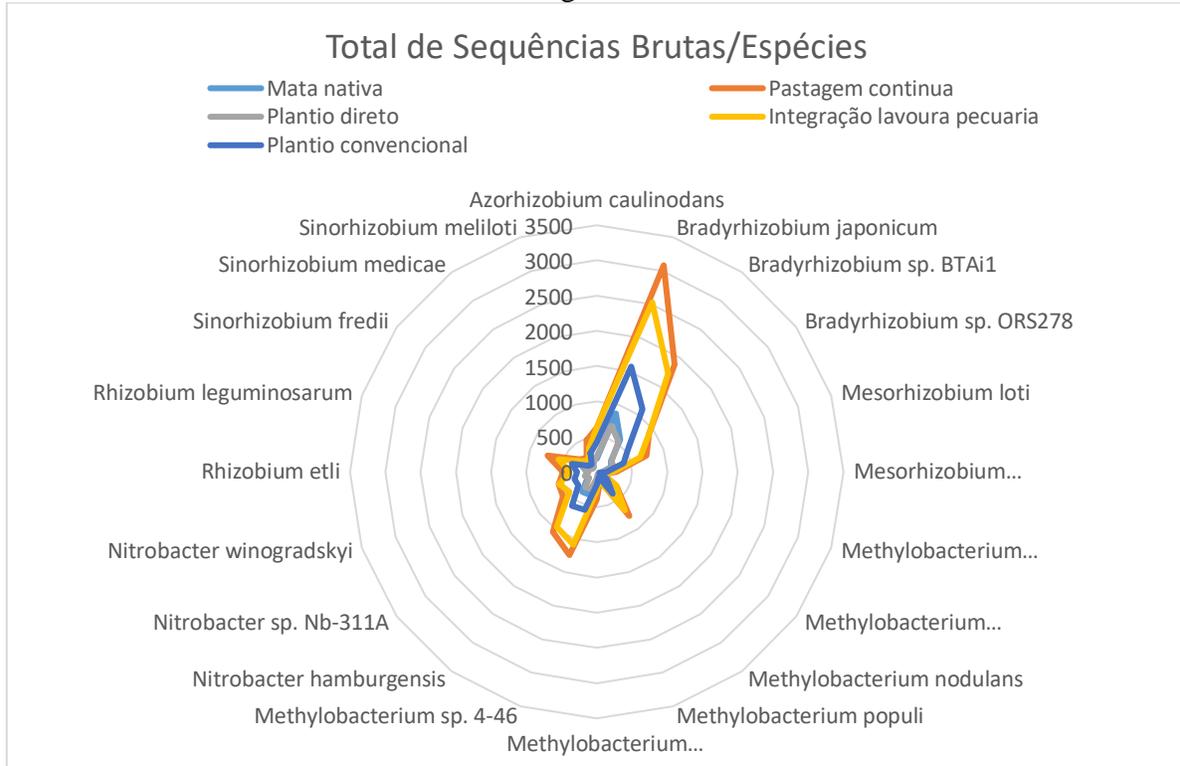
O gênero *Bradyrhizobium* mostra proporções de sequências semelhantes aos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, sendo menores apenas do que o *Mesorhizobium*. Os gêneros *Methylobacterium* e *Nitrobacter* apresentam as menores proporções, o gênero *Azorhizobium* apresenta proporções maiores que os gêneros *Methylobacterium* e *Nitrobacter* e menor quando comparado com o gênero *Sinorhizobium*.

Tabela 2. Resultados da quantidade de sequências brutas de espécies de bactérias dos sete gêneros analisados do ciclo do nitrogênio.

Espécie	Mata nativa	Pastagem contínua	Plantio direto	Integração lavoura pecuária	Plantio convencional
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	189	625	220	628	421
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	870	3082	685	2531	1570
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	566	1878	526	1723	1103
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	250	918	254	913	549
<i>Mesorhizobium loti</i>	220	746	246	647	400
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	76	270	83	227	139
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	39	93	31	68	38
<i>Methylobacterium extorquens</i>	125	351	103	334	181
<i>Methylobacterium nodulans</i>	229	781	200	680	382
<i>Methylobacterium populi</i>	51	142	41	127	80
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	114	390	92	266	181
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	341	1243	257	1088	568
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	351	1059	278	965	597
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	163	588	138	476	326
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	165	566	182	559	336
<i>Rhizobium etli</i>	138	475	116	384	282
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	207	734	208	565	371
<i>Sinorhizobium fredii</i>	127	305	72	249	141
<i>Sinorhizobium medicae</i>	73	245	76	205	129
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	200	472	147	357	281

A tabela 2 mostra a quantidade de sequências de espécies de bactérias dos sete gêneros geradas pela comparação dos dados das sequências das amostras de solo contra o banco de dados do Refseq. Foram encontradas um total de 20 espécies de bactérias do ciclo do nitrogênio, sendo uma espécie do gênero *Azorhizobium*, três espécies do gênero *Bradyrhizobium*, oito espécies do gênero *Methylobacterium*, três espécies do gênero *Nitrobacter*, duas espécies do gênero *Rhizobium* e três espécies do gênero *Sinorhizobium*. A espécie *Bradyrhizobium japonicum* retornou a maior quantidade de sequências em todas as amostras de solo principalmente nos manejos de pastagem contínua e integração lavoura pecuária.

Figura 5. Gráfico de radar da relação sequências brutas por espécies de bactérias dos sete gêneros do ciclo do nitrogênio nas amostras de solo.



A figura 4 mostra o gráfico de radar das sequências brutas por espécies de bactérias tendo uma visão bidimensional das sequências das espécies de bactérias do ciclo do nitrogênio, observa-se que as pontas do radar das amostras de solo tendem para o gênero *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium sp* ORS278.

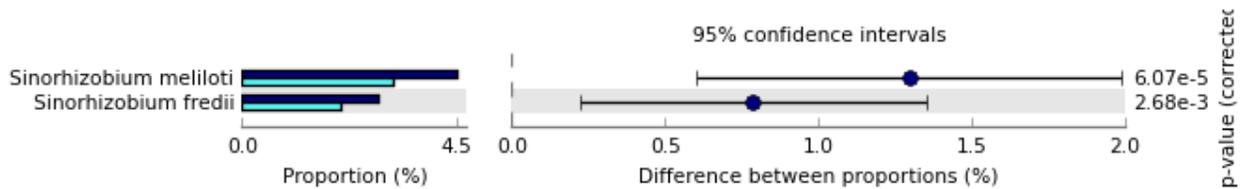
## 5.2. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa STAMP, sendo as análises feitas par a par a entre todos os manejos e mata nativa a nível de espécie, com diferença estatística significativa de 95% foi analisado o perfil de abundância taxonômica. As espécies foram identificadas após comparação com o banco de dados Refseq na plataforma do MG-Rast, sendo as espécies *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium sp. BTAi1*, *Bradyrhizobium sp* ORS278, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Methylobacterium chloromethanicum*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium*

*nodulans*, *Methylobacterium populi*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylobacterium sp. 4-46*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter sp Nb-311A*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium medicae* e *Sinorhizobium meliloti*.

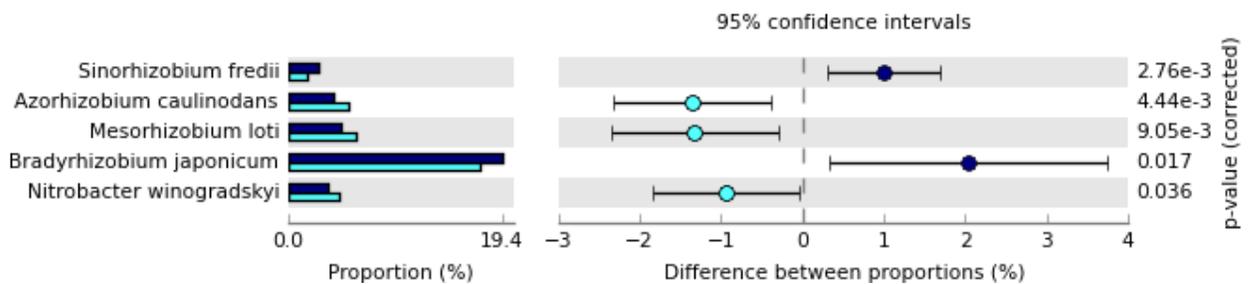
As comparações entre a amostra de mata nativa e manejo pastagem contínua apresentou diferença estatística significativa entre as espécies sendo a *Sinorhizobium meliloti* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa (Figura 6).

Figura 6. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra de mata nativa em relação ao manejo pastagem contínua. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Pastagem contínua.



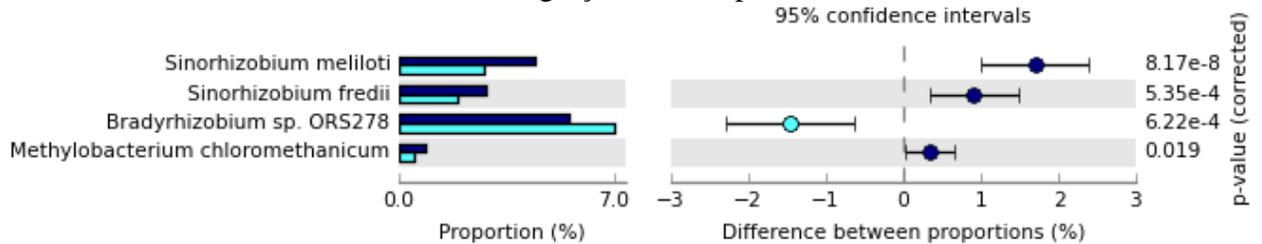
O resultado das comparações entre amostra de mata nativa e plantio direto evidenciou diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium japonicum* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa (Figura 7).

Figura 7. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo plantio direto. Azul escuro: Mata Nativa; Azul claro: Plantio direto.



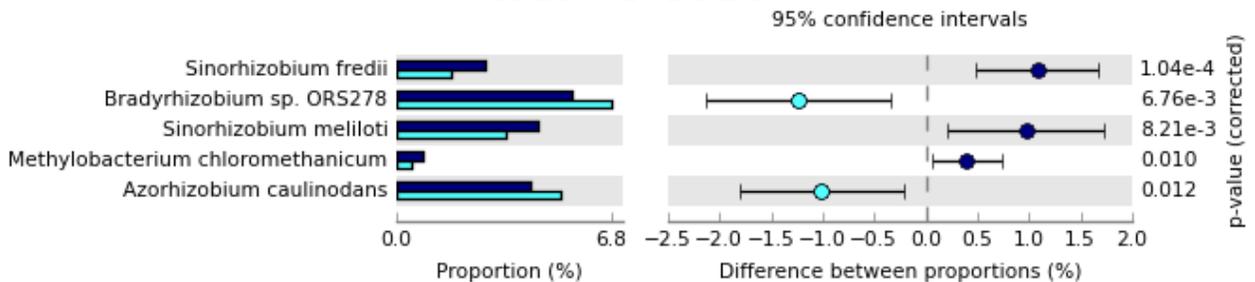
A figura 8 mostra o resultado das comparações entre amostra de mata nativa e manejo integração lavoura pecuária, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium sp. ORS278* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 8. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Mata nativa; Azul claro: Integração lavoura pecuária.



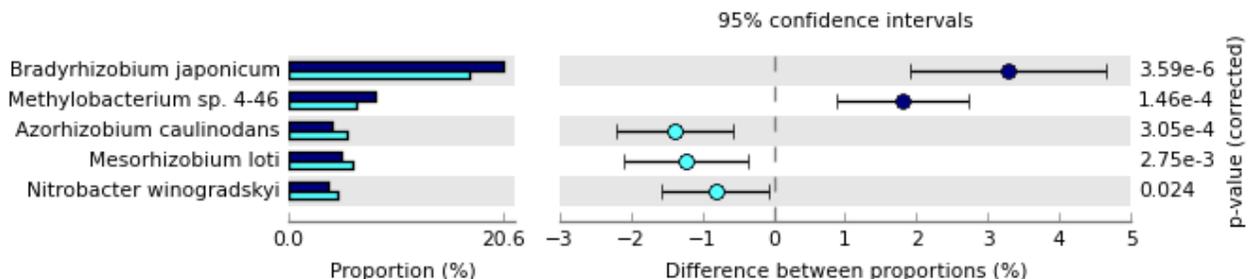
A amostra de mata nativa quando comparada com manejo plantio convencional apresentou resultados significativos estatisticamente entre as espécies sendo o *Bradyrhizobium sp. ORS278* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa (Figura 9).

Figura 9. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie da amostra mata nativa em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Mata nativa; Azul claro: Plantio convencional.



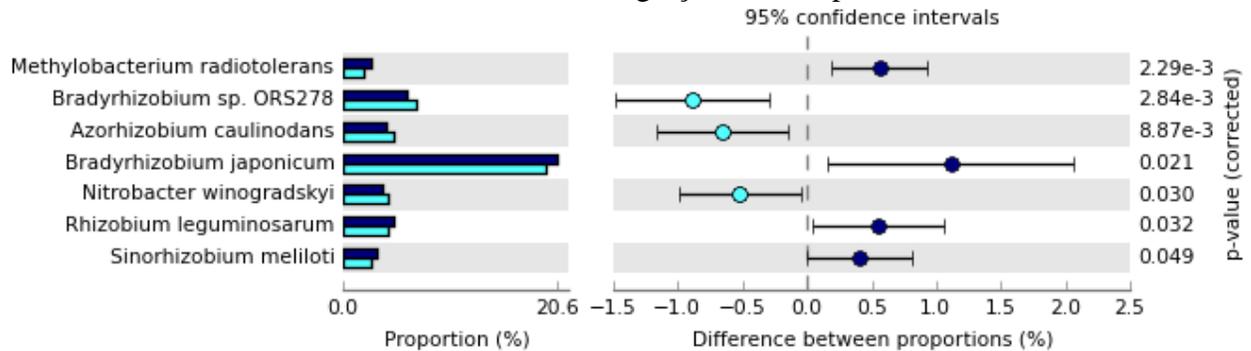
Na figura 10 mostra o resultado das comparações entre os manejos pastagem contínua e manejo plantio direto, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium japonicum* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 10. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo plantio direto. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Plantio direto.



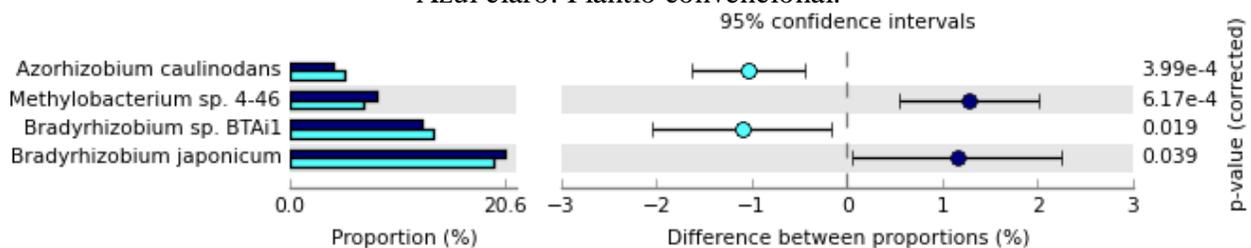
Na figura 11 mostra o resultado das comparações entre os manejos pastagem contínua e manejo integração lavoura pecuária, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium japonicum* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 11. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Integração lavoura pecuária.



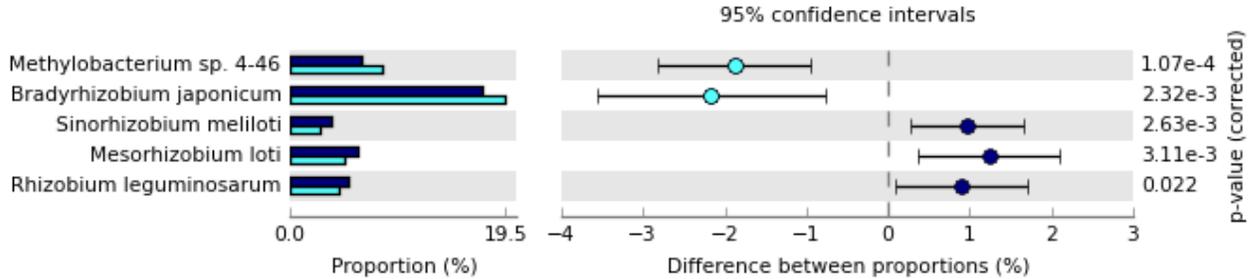
Na figura 12 mostra o resultado das comparações entre os manejos pastagem contínua e manejo plantio convencional, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium japonicum* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 12. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo pastagem contínua em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Pastagem contínua; Azul claro: Plantio convencional.



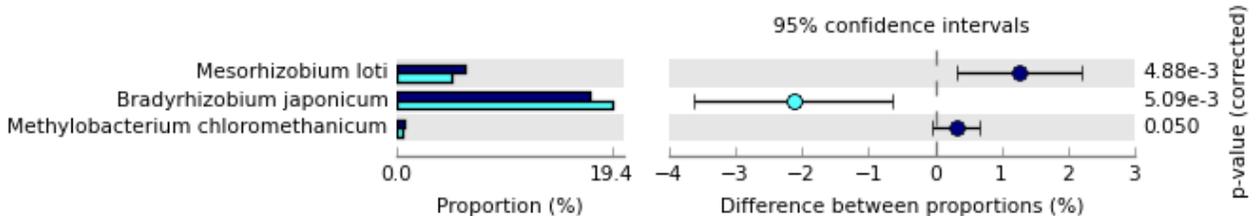
Na figura 13 mostra o resultado das comparações entre os manejos plantio direto e manejo integração lavoura pecuária, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Bradyrhizobium japonicum* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 13. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo plantio direto em relação ao manejo integração lavoura pecuária. Azul escuro: Plantio direto; Azul claro: Integração lavoura pecuária.



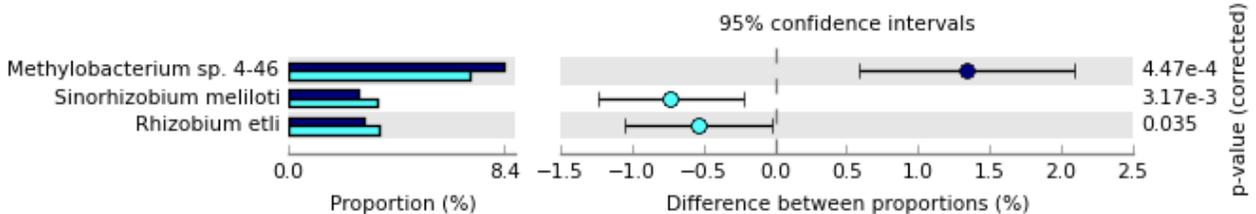
Na figura 14 mostra o resultado das comparações entre os manejos plantio direto e manejo plantio convencional, a única espécie que apresentou diferença estatística significativa foi o *Bradyrhizobium japonicum*.

Figura 14. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo plantio direto em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Plantio direto; Azul claro: Plantio convencional.



Na figura 15 mostra o resultado das comparações entre os manejos integração lavoura pecuária e manejo plantio convencional, com diferença estatística significativa das espécies sendo o *Methylobacterium sp. 4-46* com maior ocorrência em ambas as amostras e maior diferença estatística significativa.

Figura 15. Abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio a nível de espécie do manejo integração lavoura pecuária em relação ao manejo plantio convencional. Azul escuro: Integração lavoura pecuária; Azul claro: Plantio convencional.



### 5.3 Análise Funcional

O Kegg Mapper, ferramenta presente no MG RAST para mapeamento metabólico, foi utilizado para o mapeamento da atividade enzimática do ciclo do nitrogênio de bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Nitrobacter*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* nos quatro sistemas de manejos de solo e mata nativa. Dos dados analisados retornaram os mapas metabólicos para os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium* e *Nitrobacter*. Para identificação do EC (código da enzima) foi utilizado a plataforma BRENDA Enzyme Database, é um banco de dados enzimático com informações funcionais das enzimas que possuem o EC correspondente.

Na tabela 3 estão presentes o EC (código da enzima) referente a enzimas identificadas nos quatro manejos agrícolas e mata nativa dos gêneros que retornaram resultados.

Tabela 3. Código de enzimas identificadas pelo Kegg Mapper.

Gêneros	Mata	Pastagem	Plantio	Integração	(Continua) Plantio
	Nativa	Contínua	Direto	Lavoura pecuária	Convencional
<i>Azorhizobium</i>	1.7.99.4	1.4.1.2, 2.1.2.10	1.7.7.1, 6.3.1.5	1.7.99.4, 6.3.1.5, 4.2.1.1	1.4.1.2, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 4.2.1.1, 6.3.1.5
<i>Bradyrhizobium</i>	1.4.1.13, 1.4.1.14, 3.5.1.2	1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 6.3.5.4, 6.3.1.2, 4.4.1.8, 2.1.2.10, 3.5.1.49, 11.3.11.32, 1.7.7.1, 1.7.99.4	1.4.1.2, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 6.3.1.2, 3.5.1.49, 11.3.11.32, 1.7.7.1, 1.7.99.4	3.5.1.49, 11.3.11.32, 1.7.7.1, 1.7.99.4, 4.2.1.1, 2.1.2.10, 1.4.99.1, 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 6.3.1.2, 6.3.5.4	1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 6.3.5.4, 6.3.1.2, 4.4.1.8, 3.5.1.49, 11.3.11.32, 1.7.7.1, 1.7.99.4, 1.7.1.4
<i>Methylobacterium</i>	6.3.1.2, 1.4.1.13, 1.4.1.14, 1.4.99.1, 1.7.99.4, 11.3.11.32	1.7.7.1, 3.5.1.49, 11.3.11.32, 4.3.1.3, 6.3.1.2, 1.4.1.2, 3.5.5.1	1.4.1.2, 2.1.2.10	3.5.1.49, 4.3.1.3, 1.4.1.2, 1.4.1.3, 4.3.1.1, 6.3.5.4	3.5.1.49, 6.3.1.2, 6.3.5.4, 1.4.1.2

Tabela 4. Código de enzima identificadas pelo Keep Mapper.

Gênero	Mata Nativa	Pastagem Contínua	Plantio Direto	Integração Lavoura Pecuária	(Conclusão)
					Plantio Convencional
<i>Nitrobacter</i>	6.3.1.2	1.4.1.13, 1.4.1.14, 1.4.1.3, 4.4.1.8, 1.4.99.1, 6.3.1.5, 1.7.1.1	1.4.1.13, 1.4.1.14, 2.1.2.10, 6.3.1.5	1.7.1.1, 1.7.99.4, 6.3.1.5, 2.1.2.10	1.7.1.1, 1.4.1.3, 1.4.99.1, 6.3.1.5

O EC 4.2.1.1 representa a enzima Anidrase Carbônica responsável por catalisar a conversão de dióxido de carbono e água em ácido carbônico e também realizar a catalise no sentido contrário da reação, essa enzima apresentou atividade somente no manejo Integração Lavoura Pecuária.

O EC 2.1.2.10 representa a enzima Aminomethyltransferase que apresentou atividade no manejo Pastagem Contínua e Integração Lavoura Pecuária, essa enzima é um componente do sistema de clivagem da glicina, antigamente era conhecida como glicina sintase.

O EC 1.4.99.1 representava a enzima D-aminoácido desidrogenase, no entanto passou a ser listada com o EC 1.4.99.6 representando a enzima D-arginina desidrogenase, apresentou atividade enzimática no manejo Integração Lavoura Pecuária, essa enzima possui um fator FAD não covalente e uma extensa gama de substratos atuando na maioria dos D-aminoácidos, com exceção do D-glutamato e D-aspartato, atividade máxima com D-arginina e D-lisina não sendo ativo na glicina.

O EC 6.3.1.2 representa a enzima Glutamina sintetase apresentou atividade nos manejos Mata Nativa, Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, catalisa a incorporação de amônio no glutamato sendo uma enzima chave do metabolismo do nitrogênio presente em todos os domínios da vida.

O EC 3.5.1.2 representa a enzima Glutaminase que apresentou atividade enzimática no manejo Mata Nativa, é uma amidohidrolase capaz de gerar glutamato a partir de glutamina, possui isoenzimas específicas de tecido tendo uma função importante nas células glias.

O EC 1.4.1.13 representa a enzima Glutamato sintase dependente de NADPH, apresentou atividade nos cinco manejos Mata Nativa, Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, essa enzima faz parte de processo de catalisação de amônia para a formação de glutamato a partir de glutamina e 2-oxoglutarato.

O EC 1.4.1.14 representa a enzima Glutamato sintase dependente de NADH, apresentou atividade nos quatro manejos Mata Nativa, Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, essa enzima faz parte de processo de catalisação de amônia para a formação de glutamato a partir de glutamina e 2-oxoglutarato.

O EC 6.3.5.4 representa a enzima Asparagina sintase e apresentou atividade enzimática nos manejos Pastagem Contínua, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, esta enzima é responsável por catalisar reações químicas diferentes sendo a hidrólise de glutamina para produzir amônia, media a síntese de um intermediário beta-aspartil-AMP e a reação subsequente com amônia e a amônia liberada é catalisada para outro sítio ativo para produzir asparagina.

O EC 1.4.1.2 representa as enzimas Glutamato desidrogenase que apresentou atividade enzimática nos manejos Pastagem Contínua, Integração Lavoura Pecuária, Plantio Direto e Plantio Convencional, essas enzimas realizam a catalise reversível dependente de NAD ou NADP de glutamato em alpha-cetoglutarato, estando envolvidas com a assimilação da amônia ou com o catabolismo do glutamato.

O EC 1.4.1.3 assim como o número 1.4.1.2 representa o grupo de enzimas Glutamato desidrogenase, apresentou atividade enzimática nos manejos Pastagem Contínua, Integração Lavoura Pecuária e Plantio convencional, essas enzimas realizam a catalise reversível dependente de NAD ou NADP de glutamato em alpha-cetoglutarato, estando envolvidas com a assimilação da amônia ou com o catabolismo do glutamato.

O EC 4.4.1.8 representa a enzima Cistationina beta-liase, apresentou atividade nos manejos Pastagem Contínua e Plantio Convencional, essa enzima é responsável por catalisar cistationina em homocisteína, piruvato e amônia na segunda fase da biossíntese de metionina a partir de cisteína em bactérias.

O EC 3.5.5.1 representa a enzima Nitrilase apresentou atividade enzimática no manejo Pastagem contínua, atua em uma ampla variedade de nitrilas aromáticas, algumas nitrilas alifáticas e amidas ácidas correspondentes.

O EC 6.3.1.5 representa a enzima  $\text{NAD}^+$  synthase que apresentou atividade nos manejos Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional. Essa enzima forma ligações carbono-nitrogênio, responsável por catalisar substratos contendo ATP, deamino- $\text{NAD}^+$  e  $\text{NH}_3$  (amônia) em três produtos AMP (monofosfato de adenosina), difosfato e  $\text{NAD}^+$ .

O EC 3.5.1.49 representa a enzima Formamidase, apresentou atividade em todos os manejos, essa enzima é responsável por catalisar formamida e água em formato e amônia.

O EC 1.13.11.32 representa a enzima 2-nitropropano dioxigenase, apresentou atividade em todos os manejos, essa enzima é responsável por catalisar 2-nitropropano em acetona e nitrito.

O EC 1.7.99.4 representa a enzima Nitrato redutase, apresentou atividade enzimáticas nos manejos Pastagem Contínua, Plantio Direto e Integração Lavoura Pecuária, essa enzima é responsável pela redução de benzil viologen e outros corantes ocasionando na redução do nitrato.

O EC 1.7.1.4 representa a enzima Nitrito redutase [ $\text{NAD(P)H}$ ], apresentou atividade no manejo Plantio Convencional, essa enzima é responsável por catalisar a redução de nitrito em amônio na segunda parte da assimilação do nitrito, o NiR fúngico e bacteriano são proteínas homodiméricas que usam formamidase  $\text{NAD(P)H}$  como doador de elétrons.

O EC 4.3.1.1 representa a enzima Aspartato amônia-liase apresentou atividade no manejo Integração lavoura pecuária, participa do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato.

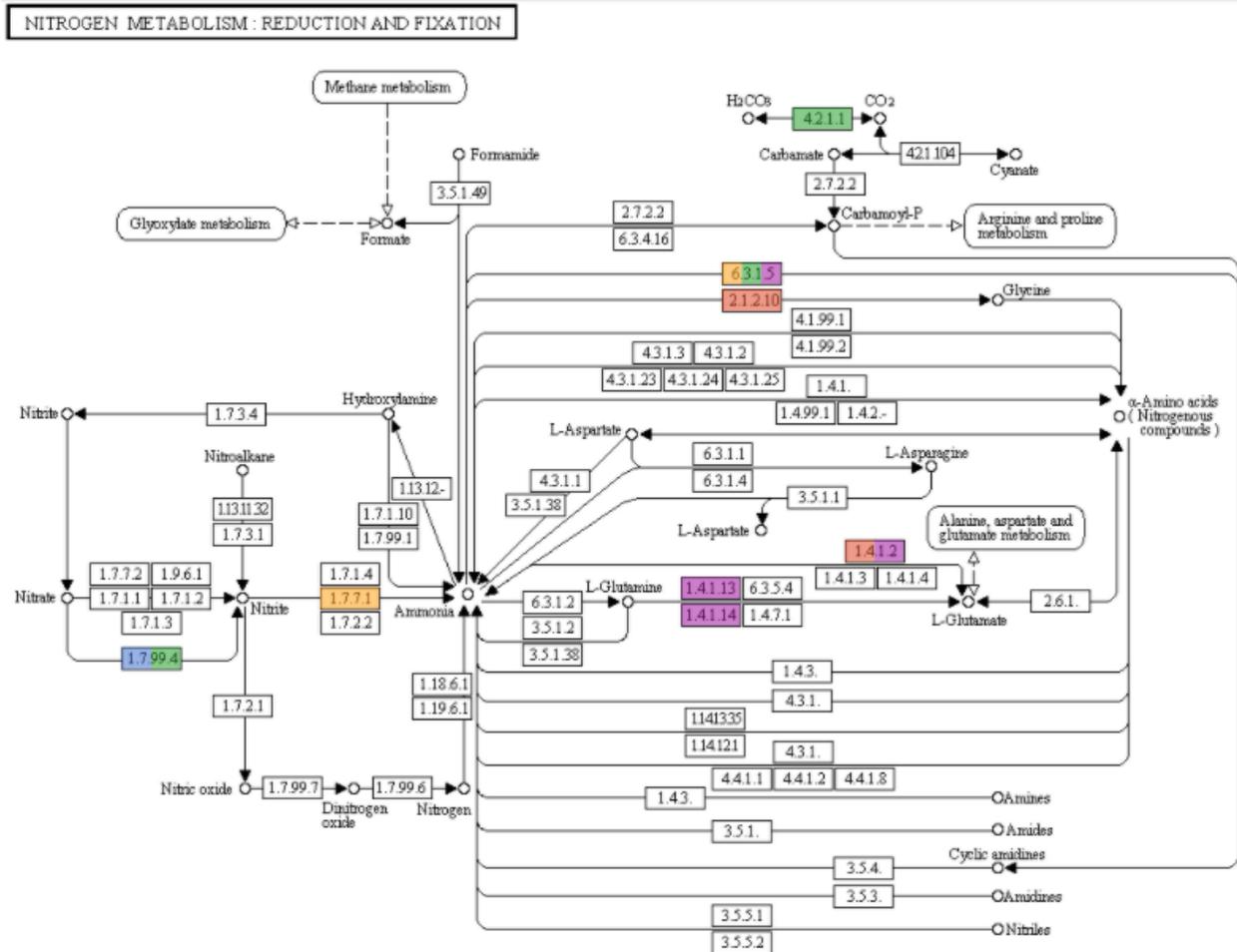
O EC 1.7.1.1 representa a enzima Nitrato redutase, apresentou atividade nos manejos Pastagem Contínua, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, essa enzima é responsável por catalisar a redução do nitrato em nitrito.

O EC 1.7.7.1 representa a enzima Ferredoxina-nitrito redutase, apresentou atividade nos manejos Pastagem Contínua, Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional, essa enzima é responsável por catalisar a redução de nitrito em amônio na segunda parte da assimilação do nitrito, sendo uma forma cloroplástica vegetal superior de NiR é uma proteína monomérica que utiliza ferredoxina reduzida como doador de elétron.

A Figura 16 mostra a atividade enzimática de bactérias do gênero *Azorhizobium*, o código da enzima (EC) correspondente a enzima que manifestou atividade enzimática e a cor representa o solo no qual ocorreu a atividade da enzima. A enzima  $\text{NAD}^+$  synthase (EC: 6.3.1.5) foi a que ocorreu em uma maior variedade de manejos apresentando atividade enzimática em três dos quatro manejos e mata nativa, sendo eles o Plantio Direto, Integração Lavoura Pecuária e Plantio

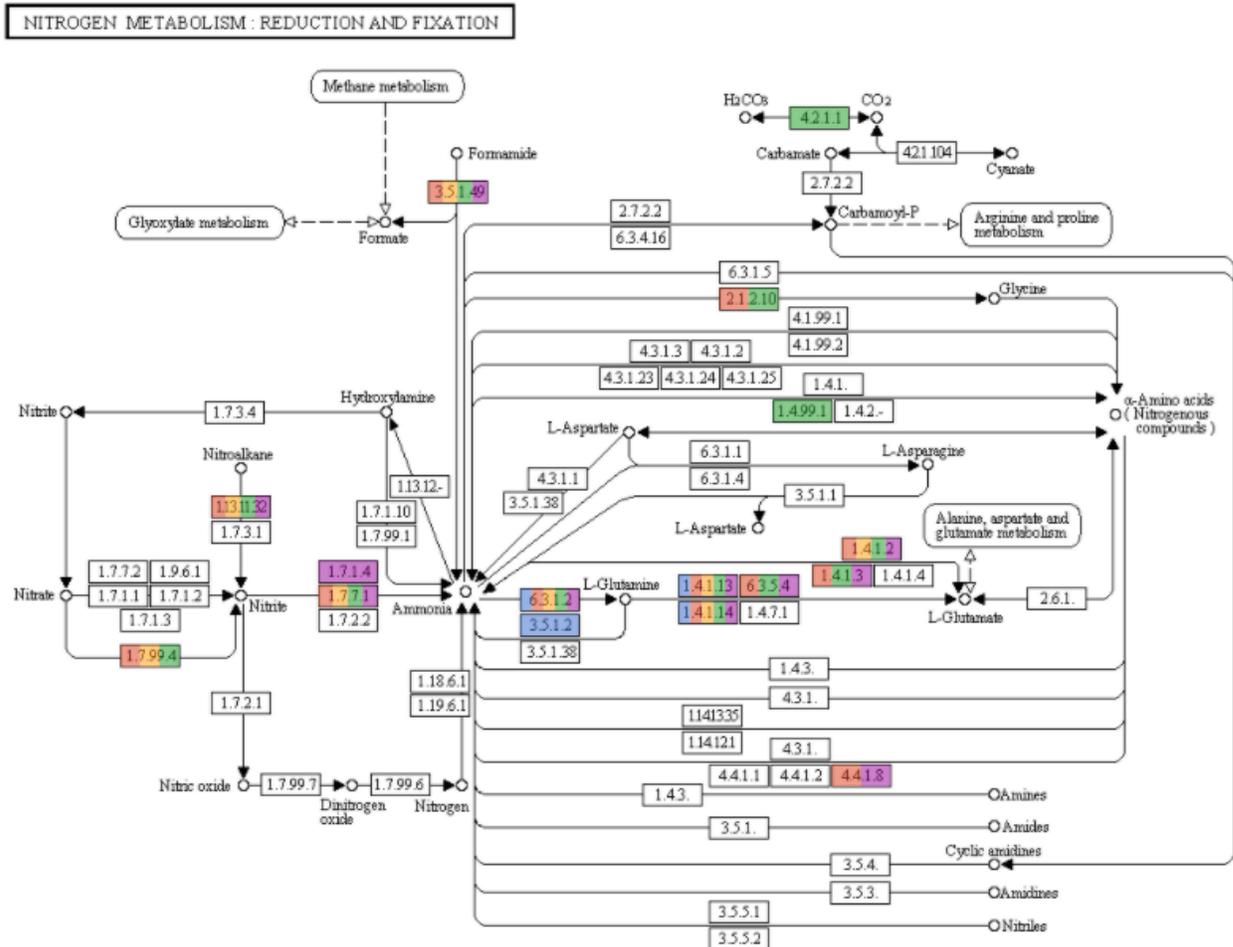
Convencional. Conforme a Figura 15, sua atuação é no ciclo das amidinas derivados da amônia, na etapa de redução do ciclo do nitrogênio. O manejo plantio convencional apresentou maior número de enzimas em atividade desse gênero sendo as enzimas Glutamato sintase dependente de NADPH, Glutamato sintase dependente de NADH, Glutamato desidrogenase e NAD<sup>+</sup> synthase.

Figura 16. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper. Atividades enzimática de bactérias do gênero *Azorhizobium*.



Azul: mata nativa; Vermelho: pastagem contínua; Laranja: plantio direto; Verde: integração lavoura pecuária; Roxo: plantio convencional

Figura 17. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper. Atividade enzimática de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

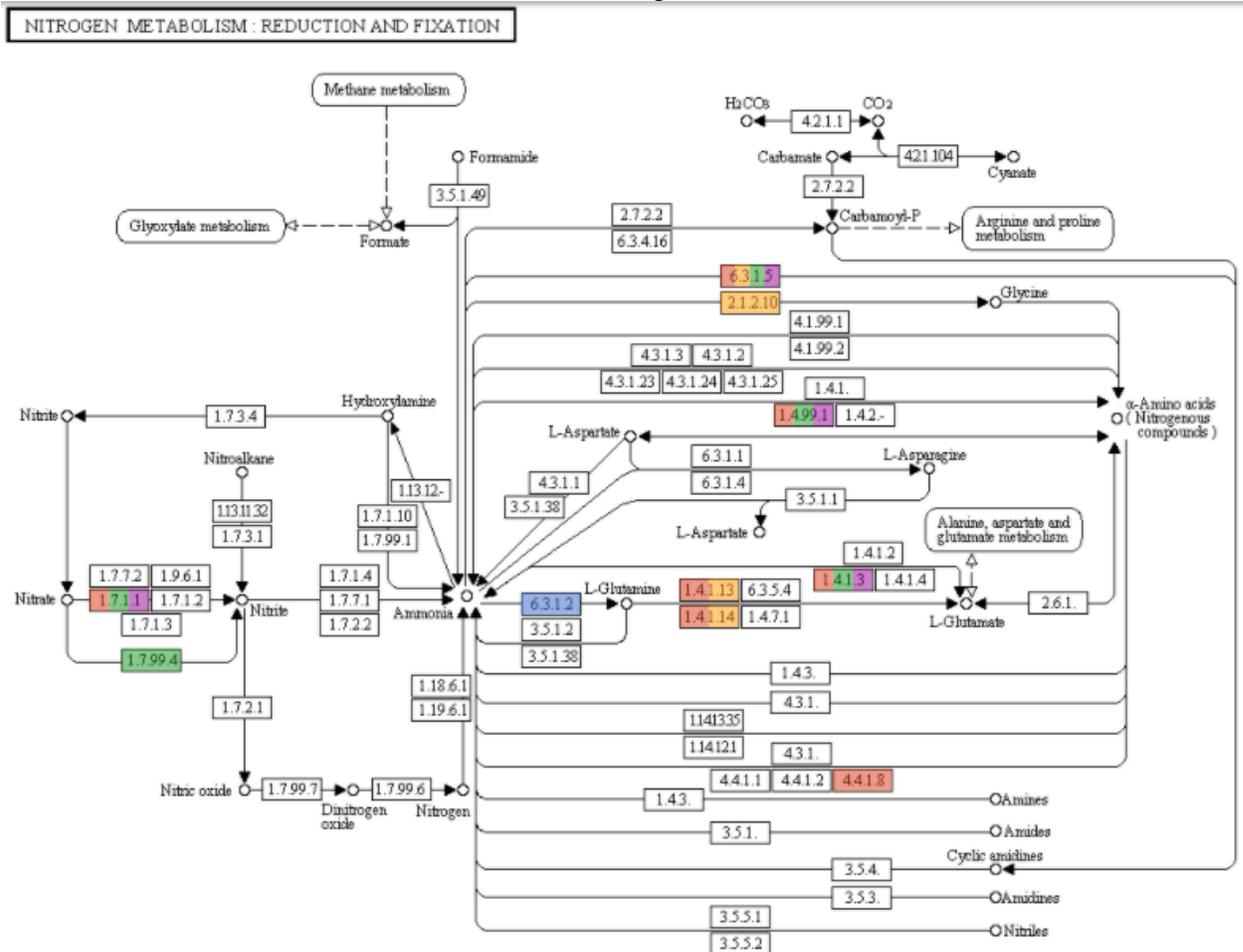


Azul: mata nativa, vermelho: pastagem contínua, laranja: plantio direto, verde: integração lavoura pecuária, roxo: plantio convencional.

A Figura 18 mostra a atividade enzimática de bactérias do gênero *Methylobacterium*, o código da enzima (EC) correspondente a enzima que manifestou atividade e a cor represente o solo no qual ocorreu a atividade da enzima. A enzima a Glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) foi a que apresentou atividade em quatro dos cinco manejos sendo eles Mata Nativa, Pastagem Contínua, Integração Lavoura Pecuária e Plantio Convencional. Essa enzima atua catalisando a incorporação de amônio no glutamato. O manejo pastagem contínua e integração lavoura pecuária apresentaram maior número de enzimas em atividade desse gênero.



Figura 19. Mapa metabólico do ciclo do nitrogênio gerado pelo Kegg Mapper Atividade enzimática bactérias do gênero *Nitrobacter*.



Azul: mata nativa, vermelho: pastagem contínua, laranja: plantio direto, verde: integração lavoura pecuária, roxo: plantio convencional.

Comparando a quantidade de enzimas entre os três mapas metabólicos, o gênero *Bradyrhizobium* foi o que apresentou o maior número de enzimas em atividade entre eles. Possivelmente um motivo que explicaria essa observação seria a profundidade da coleta da amostra que foi de 0 a 10 centímetros, pois o local da simbiose da maioria do microsimbiontes ocorre nos nódulos das raízes (FÁBIO et al., 2018) que possuem profundidades maiores. O gênero *Bradyrhizobium* possui características de fixar nitrogênio em sua forma gasosa (WOLIY et al., 2019) podendo ocorrer atividade enzimática mesmo em profundidades mais rasas. Possivelmente poderia explicar também o motivo de não ter sido constatado a atividade enzimática da enzima nitrogenase, pois essa enzima é sensível ao contato com o oxigênio (CASSETARI; SILVA;

CARDOSO, 2016), uma outra possível explicação seria a inibição da expressão do gene *nif* (responsável pela síntese da nitrogenase) pela presença de nitrato, amônia e nitrogênio na forma de aminoácidos (FÁBIO et al., 2018).

## 6. CONCLUSÃO

Foi possível verificar que houve diferenças estatisticamente significativas entre as populações de bactérias pertencentes ao ciclo do nitrogênio nas amostras de solo de Dourados sob diferentes manejos de solo e mata nativa.

Os gêneros identificados taxonomicamente pertencentes ao ciclo do nitrogênio nas amostras de manejo de solo e mata nativa foram os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Nitrobacter*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Foi possível identificar as espécies taxonomicamente pertencentes ao ciclo do nitrogênio nas amostras de manejo de solo e mata nativa sendo elas: *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium sp. BTAi1*, *Bradyrhizobium sp. ORS278*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Methylobacterium chloromethanicum*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium nodulans*, *Methylobacterium populi*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylobacterium sp. 4-46*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter sp Nb-311A*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium medicae* e *Sinorhizobium meliloti*.

Na análise funcional foram identificadas um total de 21 enzimas entre os gêneros que retornaram resultados nas amostras de manejo de solo e mata nativa sendo pertencentes aos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium* e *Nitrobacter*.

## 7. REFERÊNCIAS:

ALVES, Luana de Fátima et al. Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. **International journal of genomics**, v. 2018, 2018.

BENDAHAN, Amaury Burlamaqui. Integração Lavoura-Pecuária em pequenas propriedades: o que o produtor precisa saber. Embrapa, Brasília, 23 de agosto de 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/26123732/artigo---integracao-lavoura-pecuaria-em-pequenas-propriedades-o-que-o-produtor-precisa-saber>>. Acesso em: 23 de maio de 2021.

BRISTER, J. Rodney et al. NCBI viral genomes resource. *Nucleic acids research*, v. 43, n. D1, p. D571-D577, 2015.

BRUMWELL, Stephanie L. et al. Designer Sinorhizobium meliloti strains and multi-functional vectors enable direct inter-kingdom DNA transfer. *PloS one*, v. 14, n. 6, p. e0206781, 2019.

CASSETARI, Alice de Sousa; SILVA, Mylenne Calciolari Pinheiro da; CARDOSO, Elke Jbn. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica. In: CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; ANDREOTE, Fernando Dini. *Microbiologia do Solo*. 2. ed. Piracicaba: Divisão de Biblioteca - Dibd/esalq/usp, 2016. Cap. 8. p. 111-127.

CHEN, Wen Xin; WANG, En Tao; DAVID KUYKENDALL, L. Mesorhizobium. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-11, 2015.

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

CHIBEBA, Amaral Machaculeha et al. Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, ecosystems & environment*, v. 246, p. 291-305, 2017.

CHOMA, Adam et al. Structure of lipid A from a stem-nodulating bacterium Azorhizobium caulinodans. *Carbohydrate research*, v. 352, p. 126-136, 2012.

CRUZ, José Carlos. Sistemas de produção. Embrapa Milho e Sorgo. Novembro de 2017. Disponível em:

[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio\\_sisal/arvore/CONT000fck180cd02wx5eo0a2ndxy9o28e5x.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fck180cd02wx5eo0a2ndxy9o28e5x.html) Acesso em: 23 de maio de 2021.

- DEFEZ, Roberto; ANDREOZZI, Anna; BIANCO, Carmen. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. *Microbial ecology*, v. 74, n. 2, p. 441-452, 2017.
- DE MEYER, Sofie E. et al. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhaii* sp. nov. isolated from Sophora root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 786-795, 2016.
- DE CASTRO, José Roberto Pereira; ARAUJO, Solon. Inoculantes no agro. *AgroANALYSIS*, v. 39, n. 4, p. 40-41, 2019.
- DOURADO, Manuella Nóbrega. **Ecologia de Methylobacterium spp. na planta hospedeira**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FÁBIO BUENO DOS REIS JUNIOR (org.). Fixação Biológica de Nitrogênio: fundamentos e aplicações. In: AZEVEDO, João Lúcio; PAMPHILE, João Alencar; QUENCINE-VERDI, Maria Caroline; LACAVA, Paulo Teixeira. *Biotecnologia Microbiana Ambiental*. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2018. Cap. 6. p. 125-152.
- FAN, Yinglun et al. The soybean Rfg1 gene restricts nodulation by *Sinorhizobium fredii* USDA193. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1548, 2017.
- FEDERHEN, Scott. The NCBI taxonomy database. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D136-D143, 2012.
- FERREIRA, Ana Lucia. nocolante feito na propriedade rural aumenta produtividade de feijão-caupi em até 33%. Embrapa Agrobiologia. Rio de Janeiro. 22 de agosto de 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/26033659/inoculante-feito-na-propriedade-rural-aumenta-produtividade-de-feijao-caupi-em-ate-33>> Acesso em: 23 de maio de 2021.
- FERGUSON, Shaun et al. *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii NodD2 Enhances Competitive Nodule Colonization in the Clover-Rhizobium Symbiosis. *Applied and environmental microbiology*, v. 86, n. 18, 2020.
- FUKAMI, Josiane et al. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, v. 45, n. 3, p. 328-339, 2018.
- GAUTHIER, Jeff et al. A brief history of bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*, v. 20, n. 6, p. 1981-1996, 2019.

GHOSH, Arpita; MEHTA, Aditya; KHAN, Asif M. Metagenomic analysis and its applications. **Encyclopedia of bioinformatics and computational biology**, v. 3, p. 184-193, 2019.

GUPTA, O. P. Study and analysis of various bioinformatics applications using protein BLAST: an overview. *Advances in Computational Sciences and Technology*, v. 10, n. 8, p. 2587-601, 2017.

GREEN, Peter N. *Methylobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, p. 1-8, 2015.

HAAG, Andreas F. et al. Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol*, v. 9, n. 10, p. e1001169, 2011.

HAN, Shun et al. Shifts in *Nitrobacter*-and *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 124, p. 118-125, 2018.

HUNGRIA, Mariangela da Cunha, Rubens J. Campo. *Inoculação e inoculantes*. Embrapa Soja. 2007.

Disponível

em:

<

[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01\\_70\\_271020069133.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_70_271020069133.html)

> Acesso em: 23 de maio de 2021.

HUNGRIA, Mariangela da Cunha. *Tecnologia de coinoculação: rizóbios e Azospirillum em soja e feijoeiro*. Embrapa Soja. Março de 2014. Disponível em: <

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101148/1/folder-coinoculacao-2-copy.pdf>>

Acesso em: 23 de maio de 2021.

JIANG, Nan et al. A chemotaxis receptor modulates nodulation during the *Azorhizobium caulinodans*-*Sesbania rostrata* symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 11, p. 3174-3184, 2016.

JOBBY, Renitta et al. Biotransformation of chromium by root nodule bacteria *Sinorhizobium* sp. SAR1. *PloS one*, v. 14, n. 7, p. e0219387, 2019.

KANEHISA, Minoru et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*, v. 44, n. D1, p. D457-D462, 2016.

KANEHISA, Minoru; SATO, Yoko. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, v. 29, n. 1, p. 28-35, 2020.

KANEHISA, Minoru et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D545-D551, 2021.

- KIM, Jongsun; REES, Douglas C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.
- KIRCHER, Martin; HEYN, Patricia; KELSO, Janet. Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2011.
- KÜÇÜK, Çiğdem; KIVANÇ, Merih; KINACI, Engin. Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from bean. *Turkish Journal of Biology*, v. 30, n. 3, p. 127-132, 2006.
- KUYPERS, Marcel MM; MARCHANT, Hannah K.; KARTAL, Boran. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 5, p. 263, 2018.
- LANG, Elke et al. *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1505-1511, 2013.
- LEE, Kyung-Bum et al. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2008.
- LEGGETT, Mary et al. Soybean response to inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. **Agronomy journal**, v. 109, n. 3, p. 1031-1038, 2017.
- LÓPEZ-BAENA, Francisco J. et al. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 5, p. 755, 2016.
- LING, Jun et al. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 48, p. 13875-13880, 2016.
- LIU, Wei et al. A chemotaxis-like pathway of *Azorhizobium caulinodans* controls flagella-driven motility, which regulates biofilm formation, exopolysaccharide biosynthesis, and competitive nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 31, n. 7, p. 737-749, 2018.
- LIU, Xiaolin et al. Effects of Calcium and Signal Sensing Systems on *Azorhizobium caulinodans* Biofilm Formation and Host Colonization. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 2279, 2020.
- MADHAIYAN, Munusamy et al. Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2015.
- MELLBYE, Brett L. et al. Quorum quenching of *Nitrobacter winogradskyi* suggests that quorum sensing regulates fluxes of nitrogen oxide (s) during nitrification. *MBio*, v. 7, n. 5, 2016.

- MEYER, Folker et al. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2008.
- MORETTI, Luiz Gustavo et al. Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. *Agronomy Journal*, 2019.
- MUS, Florence et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and environmental microbiology*, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.
- NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, v. 68, n. 1, p. 12-26, 2017.
- OKAZAKI, Shin et al. Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME journal*, v. 10, n. 1, p. 64-74, 2016.
- PAÇO, A. et al. traG Gene Is Conserved across Mesorhizobium spp. Able to Nodulate the Same Host Plant and Expressed in Response to Root Exudates. *BioMed research international*, v. 2019, 2019.
- OLIVEIRA, Dâmiany Pádua et al. Viability of liquid medium-inoculation of Rhizobium etli in planting furrows with common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 53, n. 3, p. 394-398, 2018.
- PEREIRA, Rodrigo Matheus et al. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 5, p. 1921-1927, 2008.
- PLACZEK, Sandra et al. BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic acids research*, p. gkw952, 2016.
- PORTER, Stephanie S. et al. Association mapping reveals novel serpentine adaptation gene clusters in a population of symbiotic Mesorhizobium. *The ISME journal*, v. 11, n. 1, p. 248-262, 2017.
- PRAMANIK, Krishnendu et al. In silico structural and functional analysis of Mesorhizobium ACC deaminase. *Computational Biology and Chemistry*, v. 68, p. 12-21, 2017.
- REEVE, Wayne et al. Complete genome sequence of the Medicago microsymbiont Ensifer (Sinorhizobium) medicae strain WSM419. *Standards in Genomic Sciences*, v. 2, n. 1, p. 77-86, 2010.
- RENIER, Adeline et al. Nodulation of Crotalaria podocarpa DC. by Methylobacterium nodulans displays very unusual features. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 10, p. 3693-3697, 2011.

RIBEIRO, Renan Augusto et al. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1179-1184, 2012.

SÁNCHEZ, Cristina; MINAMISAWA, Kiwamu. Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (NirK) and cd 1-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS microbiology letters*, v. 365, n. 5, p. fny015, 2018.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. 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, n. 1, p. 205, 2019.

SPIECK, Eva; BOCK, Eberhard. Nitrobacter. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-11, 2015.

STAUDT, Ann K.; WOLFE, Lawrence G.; SHROUT, Joshua D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. *Archives of microbiology*, v. 194, n. 3, p. 197-206, 2012.

STRALIOTTO, Rosângela. Diversidade do rizóbio—evolução dos estudos taxonômicos. *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 221-255, 2006.

TATUSOVA, Tatiana et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research*, v. 44, n. 14, p. 6614-6624, 2016.

VIEIRA, Jairo M. Uso intensivo de pastagens. Embrapa. Abril de 1997. Disponível em: <  
[Acesso em: 23 de maio de 2021.](http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT54.html#:~:text=O%20sistema%20de%20pastejo%20mais,%C3%A1rea%20durante%20todo%20o%20ano.&text=Vale%20lembrar%20que%20pastejo%20cont%C3%ADnuo,os%20mesmos%20animais%20sem%20subdivis%C3%B5es.></a></p>
</div>
<div data-bbox=)

WHITE, David L.; Lloyd, F. Thomas. 1994. Defining Old Growth: Implications For Management. Paper presented at the Eighth Biennial Southern Silvicultural Research Conference, Auburn, AL, Nov. 1-3, 1994.

WOLIY, Kedir; DEGEFU, Tulu; FROSTEGARD, Asa. Host range and symbiotic effectiveness of N<sub>2</sub>O reducing *Bradyrhizobium* strains. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 2746, 2019.