

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Propriedades químicas e microbiológicas de solo sob cultivo de acácia-negra
(*Acacia mearnsii* De Wild) e formação secundária de Mata Atlântica*

Microbiological and chemical properties of soil under cultivation of black
wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) and secondary formation of Atlantic Forest

Raquel Garibaldi Damasceno¹* Mariana Wanderley Duarte¹ Sabrina Pinto Salamoni¹
Margaroni Fialho de Oliveira¹ Sueli Teresinha Van Der Sand (Or.)¹

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

Sueli Van Der Sand

Orientador

*Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas em formato de artigo a ser submetido para
a Revista Ciência Rural.

Porto Alegre, dezembro de 2008.

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil, E-mail: rgdamasceno@gmail.com. *Autor para correspondência.

RESUMO

*A presença e a atividade da população microbiana influenciam diretamente as propriedades químicas do solo, bem como a vegetação. Da mesma forma, as raízes das plantas fornecem um ambiente favorável para o crescimento da microbiota do solo. Baseando-se nessas premissas, o estudo objetivou avaliar a diversidade da população microbiana do solo de mata secundária preservada e duas culturas de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) de diferentes idades de cultivo, e relacioná-la com as propriedades químicas do solo e a porcentagem de atividade enzimática. As coletas foram realizadas em uma área de 2 ha localizada no município de São Sebastião do Cai em 3 pontos de cada formação vegetacional. Uma alíquota de 10g de cada amostra foi utilizada para realizar suspensões das amostras e posteriormente diluições seriadas até 10^{-3} . Aliquotas de 100 μ L de cada diluição foram semeadas, em duplicata, em placas contendo ágar para contagem (PCA) e ágar amido caseína (ACA). Após incubação e crescimento, selecionaram-se aleatoriamente trinta colônias do meio PCA para isolamento e purificação. Os gêneros e espécies foram identificados com base nos testes bioquímicos clássicos. Nas amostras de solo foi avaliado os parâmetros químicos pH, % matéria orgânica, quantidade de Al, CTC, % argila e teores dos macronutrientes P, K, Ca e Mg. Os dados foram analisados por blocos ao acaso, a comparação entre as médias foi realizada através do Índice DMS a 5% de probabilidade do erro experimental e a diversidade foi obtida pelo Índice de Shannon, através do software DivEs. O tipo de cobertura vegetal que apresentou as propriedades químicas de um solo de melhor qualidade foi a mata secundária, bem como a maior diversidade microbiana. Entretanto, o gênero *Bacillus* predominou nos 3 tipos de vegetação analisados, provavelmente, devido à presença de endósporo nesse grupo, estrutura que melhor resiste ao estresse ambiental. A maioria dos isolados apresentou atividade enzimática, contudo não predominou em um único tipo de vegetação, sinalizando que a presença do gênero *Bacillus* foi o maior responsável pela presença das enzimas.*

Palavras-chave: *microbiologia do solo, diversidade microbiana, interação planta-microrganismo*

ABSTRACT

*The presence and activity of microbial population directly influence the chemical properties of soil and the vegetation. Similarly, the roots of the plants provide a favorable environment for the growth of microbial soil. Based on these assumptions, the study aimed to evaluate the diversity of soil microbial population of secondary forest preserved and two cultures of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) of different ages of cultivation, and relate with the chemical properties of soil and the percentage of enzyme activity. The collections were held in an area of 2 hectares located in the city of São Sebastião do Cai in 3 points of each training vegetation. A rate of 10g of each sample was used to carry out suspensions of the samples and then serial dilutions up 10^{-3} . Aliquots of 100 μ L of each dilution were sown in duplicate, on plates containing plate count agar (PCA) and casein starch agar (ACA). After hatching and growth, were selected randomly thirty colonies of the PCA medium for isolation and purification. The genera and species were identified based on classical biochemical tests. Samples of soil was evaluated the chemical parameters pH, % organic matter, quantity of Al, CTC, % clay and levels of nutrients P, K, Ca and Mg. The data were analyzed by randomized block, the comparison between the average index was performed by DMS at 5% probability of trial error and the diversity was obtained by index of Shannon by the software Dives. The type of vegetation cover that showed the chemical properties of soil was of better quality secondary forest and the higher microbial diversity. However, the genera *Bacillus* predominated in the 3 vegetation types studied, probably because of the presence of endospores in this group, the structure that better resist environmental stress. Most of the isolates showed enzymatic activity, however not dominated by a single type of vegetation, signaling that the presence of the genera *Bacillus* was largely responsible for the presence of enzymes.*

Key-words: soil microbiology, microbial diversity, plant-microorganism interaction

INTRODUÇÃO

Vistos com especial interesse pela área ambiental e agrícola, os microrganismos são um dos maiores responsáveis pela fertilidade do solo, atributo este fundamental para o crescimento das plantas.

As análises qualitativa e quantitativa dos microrganismos podem ser parâmetros significativos para mensurar a qualidade do solo. Isso se deve ao fato de que a comunidade microbiana, principalmente a que compõe a rizosfera, produz compostos extracelulares que auxiliam na agregação do solo, bem como antibióticos e hormônios promotores de crescimento que permitem um melhor desenvolvimento da vegetação e de outros microrganismos.

Ao mesmo tempo, a microbiota do solo realiza a degradação de substâncias tóxicas, participa no controle biológico de patógenos de plantas e solubiliza minerais do solo, disponibilizando-os para si e outros organismos.

Além dos benefícios nutricionais que o solo proporciona para as plantas, através da disponibilidade de minerais advindos da Capacidade de Troca de Cátions (CTC), a presença de matéria orgânica gera uma maior estruturação do solo, pois liga-se às partículas como areia e argila, formando poros e canais por onde ar e água podem transitar. Da mesma forma, a liberação de exsudatos pelas plantas e compostos extracelulares por bactérias e fungos auxiliam na formação de agregados, que são a unidade básica do solo estruturado.

Um grupo de espécies vegetais que apresentam importante função quando se refere à melhora na qualidade do solo são as leguminosas arbóreas. Dentre elas, a acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) destaca-se por sua importância ecológica, devido à sua capacidade de auxiliar na reabilitação de solos degradados, através de associações formadas entre as raízes da planta e rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares, estes que realizam a fixação de nitrogênio e solubilização de fosfatos, respectivamente (SOUCHIE et al., 2005). Além disso, a acácia-negra possui grande importância econômica, por meio do aproveitamento da madeira (celulose, aglomerados, lenha e carvão) e da casca - para extração de tanino, utilizado pela indústria do couro (CALDEIRA et al., 2001).

Em um ambiente dito natural, como um solo de Mata Atlântica, a quantidade e a riqueza de fungos e bactérias são expressivas, pois há um contínuo aporte de material vegetal, este que serve como substrato para o crescimento microbiano. Nessa formação vegetal, a temperatura e umidade estão em valores que beneficiam a rápida multiplicação dos microrganismos.

Entretanto, segundo ZILLI (2003), apesar do esforço empregado e muitos resultados obtidos, especialmente nos últimos 10 anos, existem ainda limitações que dificultam a correlação da diversidade microbiana com o conceito de qualidade do solo. Apesar de significativa presença no solo, a microbiota apresenta uma diversidade ainda desconhecida, pois os métodos de identificação ainda não mostram com precisão a real população microbiana presente neste ambiente. As metodologias utilizadas ainda necessitam de ajustes para reproduzir os diversos parâmetros ambientais, como temperatura, pH, umidade, salinidade, teor de matéria orgânica, entre outros. E devido às constantes variações desses parâmetros no solo, a reprodução em laboratório das reais condições do ambiente geram dificuldades na obtenção de dados que realmente representem a diversidade do solo. Além da dificuldade de reprodução das condições ambientais, existem as limitações oriundas diretamente de técnica a ser utilizada para a identificação e caracterização da população microbiana presente no solo.

A mais de um século os testes bioquímicos são usados para a identificação de microrganismos, baseados na sua habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, amido, celulose) ou observando os produtos finais de seu metabolismo (nitrito, fenilalanina, catalase) (BETTELHEIM, 1994).

Com base nas premissas acima citadas, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a diversidade da população microbiana do solo presente em uma área do domínio fitogeográfico de Mata Atlântica, em sua formação secundária, bem como dois povoamentos de acácia-negra, com três e doze anos de cultivo. Além disso, comparar o tipo de vegetação e a diversidade dos microrganismos de cada área com as propriedades químicas do respectivo solo e a presença de atividade enzimática de diversas enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos isolados nos solos de cada ponto de coleta.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O entendimento atual do conceito de qualidade de solo compreende o equilíbrio entre os condicionantes geológicos, hidrológicos, químicos, físicos e biológicos do solo (BRUGGEN & SEMENOV, 2000; SPOSITO & ZABEL, 2003). Esse termo, muitas vezes utilizado como sinônimo de saúde do solo, refere-se à capacidade do solo em sustentar a produtividade biológica dentro das fronteiras do ecossistema, mantendo o equilíbrio ambiental e promovendo a saúde de plantas, animais e do próprio ser humano (DORAN et al., 1996; SPOSITO & ZABEL, 2003).

Baseando-se neste conceito, BLUM & SANTELISES (1994) atribuíram seis funções principais do solo, sendo três ecológicas e três ligadas à atividade humana. As funções ecológicas incluem: a) produção de biomassa (alimentos, fibras e energia); b) filtração, tamponamento e transformação da matéria para proteger o ambiente, da poluição das águas subterrâneas e dos alimentos; c) habitat biológico e reserva genética de plantas e animais, que devem ser protegidos da extinção. As funções ligadas à atividade humana incluem: a) meio físico que serve de base para estruturas industriais e atividades sócio-econômicas, habitação, sistema de transportes e disposição de resíduos; b) fonte de material particulado (areia, argila e minerais); c) parte da herança cultural, paleontológica e arqueológica, importantes para a preservação da história da humanidade.

Segundo ANGERS et al. (1993), os microrganismos constituem uma importante ferramenta para a determinação da qualidade do solo, e portanto, podem ser utilizados como bioindicadores, tendo em vista que desempenham papel chave na ciclagem de nutrientes. Entretanto, a percepção de qualidade do solo evoluiu, principalmente nos últimos 10 anos, e, num entendimento mais amplo, observa-se que não basta apenas o solo apresentar alta fertilidade, mas, também, possuir boa estruturação e abrigar uma alta diversidade de organismos (ZILLI et al., 2003).

Um grupo representativo de microrganismos encontrados em solos naturais e agrícolas são bactérias em forma de bastonetes, aeróbias ou anaeróbias facultativas e formadoras de esporos, no qual o gênero *Bacillus* é o mais comumente encontrado. Os traços fisiológicos comuns importantes para a sobrevivência de tais bactérias incluem a produção de uma parede celular com estrutura em multicamada, a formação de endósporos

resistentes ao estresse e a secreção de vários compostos como antibióticos, moléculas sinalizadoras e enzimas extracelulares (GARDENER, 2004).

Para que haja um desenvolvimento microbiano no solo, as propriedades químicas assumem grande importância, pois delas dependem a biodisponibilidade de nutrientes e a formação de um ambiente favorável para que se proporcione o crescimento dos microrganismos. Essas propriedades são determinadas pelo processo geológico da formação do solo, origem dos minerais, e sua evolução de acordo com o clima e o relevo do local, além dos organismos vivos que o habitam (CETESB, 2008).

Dentre os parâmetros químicos mais estudados de fertilidade do solo destacam-se CTC, porcentagem de matéria orgânica, pH e teores de P, K, Ca, Mg e Al. De acordo com MEURER (2004), a CTC representa a capacidade que a argila e a matéria orgânica do solo têm em reter e posteriormente liberar cátions, principalmente Ca, Mg, K e NH_3 . Logo, está relacionada à quantidade de sítios livres para a ligação desses cátions, proporcionando a diminuição do processo de lixiviação.

Um importante indicador físico da qualidade do solo é a agregação; solos com menos porcentagem de argila possuem menor estabilidade dos agregados, o que o torna mais sensível a processos erosivos (MIYAUCHI, 2007).

Dentre os parâmetros biológicos, as enzimas produzidas por microrganismos destacam-se por serem as mediadoras do catabolismo biológico dos componentes orgânico e mineral do solo. A atividade enzimática do solo possui as características de: a) ser relacionada com a matéria orgânica, com as propriedades físicas e com a atividade e biomassa microbiana; b) ser um claro indicador de mudanças na qualidade do solo; c) envolver metodologias simplificadas (DICK, 1997). Além disso, a atividade enzimática pode ser utilizada como medida de atividade microbiana, produtividade e efeito de poluentes no solo. TAYLOR et al. (2002) sugerem duas razões para avaliar as enzimas do solo; a primeira, como informativo do potencial bioquímico e de manipulação do solo; a segunda, como indicador de qualidade devido à sensibilidade para prover informações sobre mudanças nas funções-chave do solo.

Embora as enzimas estejam presentes no solo em grandes quantidades, apenas pouco mais de cinquenta têm sido identificadas ou sua atividade no solo detectada (MAJER

et al., 2000). Mesmo assim, sabe-se que elas têm grande importância na decomposição de resíduos e na fertilidade do solo, na eficiência do uso de fertilizantes, nas interações entre as plantas, no estado de oxi-redução do solo, além de servirem como indicadoras da qualidade do solo e da presença de poluentes.

Embora os métodos para determinação da atividade enzimática sejam baseados em condições não reais, eles são capazes de responder às questões qualitativas sobre processos metabólicos específicos, e, em combinação com outros métodos, podem aumentar a compreensão acerca do efeito de agroquímicos, adequação de práticas de manejo, poluentes, e fatores climáticos na atividade microbiana do solo (NANNIPIERI et al., 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

O local de estudo compreende uma área rural de 2ha no município de São Sebastião do Caí, estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). A coleta foi realizada dia 26 de agosto de 2007, com uma temperatura ambiental de 17°C, umidade relativa do ar de 70% e tempo nublado.

Solos de três locais foram coletados: cultivo de acácia-negra de 3 anos, cultivo de acácia-negra de doze anos (no qual havia a formação de um sub-bosque) e mata secundária de Mata Atlântica (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente). Três amostras de solo foram coletadas em cada um dos locais, perfazendo nove amostras. Em cada ponto de amostragem foram coletadas quinze sub-amostras em uma área de 9m² na camada 0-10 cm do solo. Estas foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração até o local de análise.



Fonte: A autora.



Fonte: A autora.

Figura 1. Cultivo de acácia-negra de três anos.

Figura 2. Cultivo de acácia-negra de doze anos.



Fonte: A autora.

Figura 3. Formação secundária de Mata Atlântica.

Para a análise química, parte das amostras foi levada ao Laboratório de Análises da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os atributos analisados foram teor de matéria orgânica, pH, porcentagem de argila, capacidade de troca de cátions (CTC), quantidade de Al e os nutrientes P, K, Ca e Mg.

A análise microbiológica foi realizada no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras foram processadas misturando-se 10g de solo em 90mL de água peptonada. Com a solução obtida procedeu-se diluições seriadas até 10^{-3} . Para o isolamento dos microrganismos, alíquotas de 100 μ L de todas foram inoculadas em placas de Petri pelo método de semeadura em superfície contendo os seguintes meios de cultura: Ágar de Contagem em Placa - PCA (para quantificação de bactérias heterotróficas totais) e Ágar Amido Caseína - ACA (para actinomicetos). As placas foram incubadas na temperatura de 37°C por 48h para o crescimento das heterotróficas e por 4 semanas para o crescimento de actinomicetos.

Após o crescimento dos microrganismos, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). As placas que continham menos de 30 e mais de 300 colônias foram descartadas. Para o isolamento, selecionaram-se, aleatoriamente, cerca de

30 colônias de cada placa de PCA e ACA, de todas as diluições. As heterotróficas foram semeadas em placas com meio agar tripticaseína de soja (TSA) e os actinomicetos em ACA, pelo método de esgotamento. Após o isolamento, os actinomicetos foram armazenados para futuros trabalhos e somente os heterotróficos foram alvos de identificação.

Para certificar a pureza das colônias e realizar uma primeira identificação, procedeu-se à coloração de Gram; e a fim de caracterizar morfológicamente, os microrganismos foram submetidos aos testes de KOH, coloração de endósporo e meio EMB (ágar Eosina Azul de Metileno).

Após a divisão entre bactérias Gram positivas e negativas, procedeu-se diversos testes com o intuito de traçar o perfil bioquímico dos microrganismos, dentre eles: citrato, SIM, VM/VP, fenilalanina-desaminase, nitrato, açúcares (glicose, xilose, trealose, manitol, sacarose e manose), oxidação-fermentação, caseína, esculina e arginina. Para identificação dos microrganismos, utilizaram-se as classificações de acordo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) e MAC FADDIN (1999).

A presença das enzimas catalase, oxidase, gelatinase, amilase, pectinase e celulase foram testadas para todos os isolados.

A partir dos resultados obtidos, os dados foram analisados por blocos ao acaso e a comparação entre as médias foi realizada através do Índice DMS ao nível de 5% de probabilidade do erro experimental. A diversidade dos microrganismos foi calculada através do Índice de Shannon (H'), utilizando o software DivEs (RODRIGUES, 2005) a partir da equação 1:

$$H' = n \log n - \sum f_i \log f_i/n, \quad [1]$$

onde n representa o número de indivíduos amostrados em um levantamento, e f_i o número de indivíduos na espécie i .

Ao final, calculou-se o coeficiente de correlação (R) do teor de matéria orgânica e do Índice de Shannon com os atributos químicos de fertilidade do solo CTC, P, K e Ca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise química:

Os valores encontrados após análise química do solo estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Parâmetros químicos do solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos (A3), de doze anos (A12) e da mata secundária (MS) em São Sebastião do Caí.

Ponto	Argila (%)	pH	%MO	CTC
				($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$)
A3	21,00 a	5,80 a	2,35 a	10,55 a
A12	19,00 a	5,20 a	3,80 ab	11,85 a
MS	14,5 a	6,00 a	6,95 b	20,90 b

As letras semelhantes não diferem entre si pelo Índice DMS ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Nutrientes e Al trocável do solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos (A3), de doze anos (A12) e da mata secundária (MS) em São Sebastião do Caí.

Ponto	P	K	Ca troc.	Mg troc.	Al troc.
	(mg/dm ³)		(cmol _c /dm ³)		
A3	3,10 a	71,50 a	3,60 a	0,70 a	0,55 a
A12	3,75 a	90,00 a	3,70 a	1,30 a	0,25 a
MS	3,55 a	208,00 b	13,65 b	2,80 a	0,00 a

As letras semelhantes não diferem entre si pelo Índice DMS ao nível de 5% de probabilidade.

Os parâmetros teor de argila, pH e os minerais P, Mg trocável e Al trocável não apresentaram variação significativa nas 3 amostras de solo (Tabelas 1 e 2). Entretanto, os nutrientes K e Ca trocável apresentaram diferença estatisticamente significativa, com valores mais elevados na mata secundária, em relação aos dois cultivos de acácia-negra.

A ausência de significância estatística dos minerais P e Mg entre os locais amostrados, fato que poderia ser distinto para os valores da mata secundária, poderia ser

explicado segundo POMPÉIA (1994), na qual a diminuição do pH do solo tem efeito direto na lixiviação dos macronutrientes, o que pode ocasionar perda na fertilidade do solo. Logo, os valores semelhantes de pH nos 3 locais podem ser o responsável pela captação similar de P, Mg e Al (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Por ser um parâmetro ligado às propriedades físicas do solo, a porcentagem de argila não mostrou variação de acordo com o tipo de vegetação, provavelmente porque os locais de coleta eram próximos entre si.

Os minerais potássio e o cálcio apresentaram diferença estatística significativa na mata secundária em relação aos dois povoamentos de acácia-negra, provavelmente devido ao fato de serem os nutrientes mais prontamente liberados pelos resíduos orgânicos, além de fazerem parte dos constituintes dos tecidos vegetais (MALAVOLTA et al., 1989). Conseqüentemente, suas quantidades estão diretamente relacionadas à densidade de vegetação.

A porcentagem de matéria orgânica nos 3 locais amostrados (Tabela 1) demonstra que o cultivo de acácia-negra com três anos de cultura exibe um menor teor, 2,35%. A mata secundária foi o tipo de vegetação que apresentou os maiores valores, 6,95%, enquanto que o cultivo de acácia-negra de 12 anos apresentou valores intermediários de matéria orgânica (3,80%). Essas porcentagens demonstram que a densidade de plantas por área, bem como a idade da vegetação são fatores que podem influenciar na quantidade de matéria orgânica do solo.

Maiores concentrações de matéria orgânica podem gerar outros fatores benéficos para o solo, e conseqüentemente para a vegetação, pois foi encontrada, na mata secundária, os maiores valores de CTC. Como a matéria orgânica é a maior responsável pela CTC em solos de Mata Atlântica, maiores teores desse composto geram uma maior CTC (Figura 4), fato corroborado pelo alto fator de correlação, $R=0,93$. Portanto, os valores de CTC do solo nos três tipos de vegetação obedecem à mesma lógica da quantidade de matéria orgânica ($A3 < A12 < MS$), com uma diferença estatística significativa na mata secundária (Tabela 1).

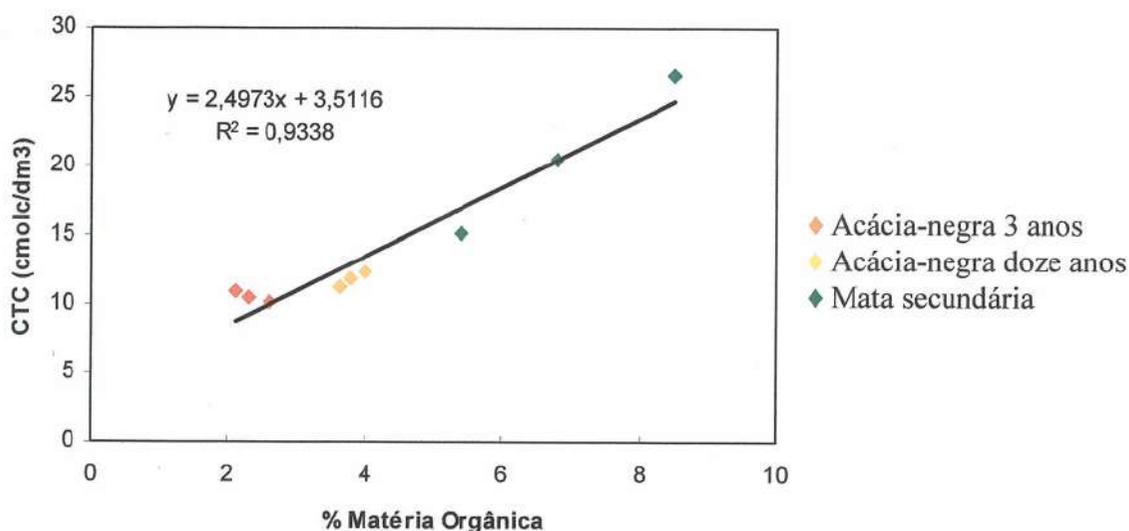


Figura 4. Influência do teor de matéria orgânica na CTC do solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos, de doze anos e da mata secundária em São Sebastião do Caí.

A partir da relação entre porcentagem de matéria orgânica e alguns dos nutrientes mais importantes do solo, P, K e Ca, observou-se uma baixa correlação com o fósforo, $R=0,26$. De acordo com ANGHINONI & BISSANI (2004), isso se deve ao fato de que, apesar dos solos conterem grandes quantidades de P, a sua disponibilidade para as plantas é muito pequena devido a sua tendência em formar compostos de baixa solubilidade no solo. Entretanto, uma forte correlação foi observada com o potássio e o cálcio, $R=0,97$ e $0,91$, respectivamente, estes que são elementos abundantes por exercerem importantes funções reguladoras dentro da célula, além de comporem enzimas e parede celular dos microrganismos.

Análise microbiológica:

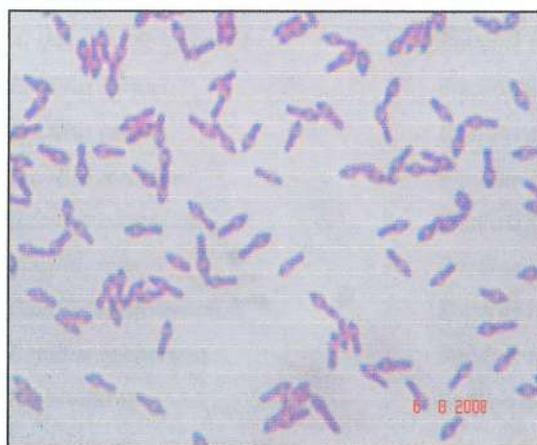
Na análise microbiológica, o número de UFC que cresceram nos meios de cultura, bem como as espécies e gêneros encontrados no meio PCA após realização do perfil bioquímico, estão discriminados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Número médio de UFC de bactérias heterotróficas totais (meio PCA) e actinomicetos (meio ACA) por grama de solo seco do cultivo de acácia-negra de 3 anos (A3), de doze anos (A12) e da mata secundária (MS) em São Sebastião do Caí.

Ponto	UFC x 10 ⁴ g ⁻¹ de solo seco	
	PCA	ACA
A3	2,64 a	0,75 a
A12	6,56 a	0,37 a
MS	4,35 a	0,84 a

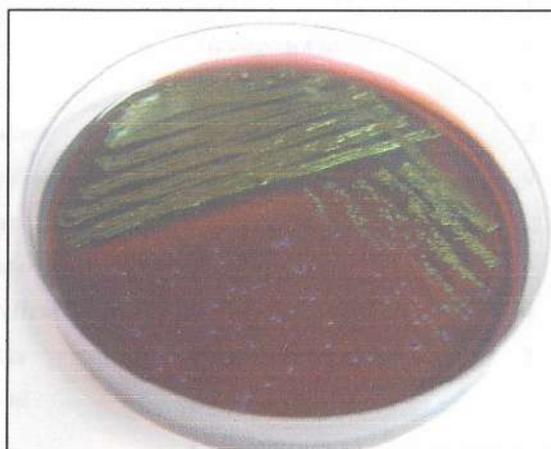
As letras semelhantes não diferem entre si pelo Índice DMS ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados das UFCs encontrados nos meios PCA e ACA, a quantidade de bactérias heterotróficas totais e actinomicetos não obteve uma diferença estatística significativa, demonstrando que esses organismos podem não sofrer influência do tipo de vegetação (Mata Atlântica ou monocultura de acácia-negra).



Fonte: Mariana Wanderley Duarte.

Figura 5. Coloração de Gram mostrando endósporos de *Bacillus sphaericus*.



Fonte: A autora.

Figura 6. *E. coli* em meio Eosina Azul de Metileno (EMB)

A partir dos resultados da identificação das bactérias isoladas nos 3 pontos de coleta (Tabela 4), pode-se observar uma variação nas espécies encontradas de acordo com o tipo de vegetação. No povoamento de acácia-negra de 3 anos encontraram-se apenas espécies do gênero *Bacillus* – 86,49% dos isolados desse ponto - como representante do grupo de bactérias Gram positivas, com 7 espécies diferentes, e 5 gêneros de bactérias Gram

negativas: *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Stenotrophomonas*. Endósporos de *Bacillus sphaericus* estão ilustrados na Figura 5.

O cultivo de acácia de doze anos apresentou a menor diversidade dos 3 pontos coletados, com somente 2 gêneros, Gram positivos: *Bacillus*, representado por 8 espécies e perfazendo 97,96% do total de isolados do ponto, e também o gênero *Kurthia*.

A mata secundária foi a formação vegetal que obteve a diversidade mais elevada, onde se encontrou 3 gêneros de bactérias Gram positivas: *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Kurthia*, além de 5 gêneros de Gram negativas - *Alcaligenes*, *Cellulomonas*, *Chryseomonas*, *Escherichia* (Figura 6) e *Xanthomonas*. O gênero *Bacillus* constituiu 76,60% do número de isolados da mata secundária, com oito espécies distintas. Este gênero apresentou a menor porcentagem quando comparado aos povoamentos de acácia-negra.

Tabela 4. Relação das bactérias heterotróficas totais isoladas em meio PCA e Índice de Diversidade de Shannon do solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos (A3), de doze anos (A12) e da mata secundária (MS) em São Sebastião do Caí.

Espécies em A3	I	Espécies em A12	I	Espécies em MS	I
<i>Acinetobacter baumanbi</i>	1	<i>Bacillus badius</i>	6	<i>Alcaligenes latus</i>	1
<i>Bacillus badius</i>	2	<i>Bacillus cereus</i>	7	<i>Bacillus badius</i>	3
<i>Bacillus cereus</i>	1	<i>Bacillus circulans</i>	11	<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Bacillus circulans</i>	15	<i>Bacillus coagulans</i>	12	<i>Bacillus circulans</i>	9
<i>Bacillus coagulans</i>	8	<i>Bacillus firmus</i>	5	<i>Bacillus coagulans</i>	11
<i>Bacillus firmus</i>	3	<i>Bacillus megaterium</i>	4	<i>Bacillus firmus</i>	2
<i>Bacillus megaterium</i>	2	<i>Bacillus sphaericus</i>	2	<i>Bacillus megaterium</i>	4
<i>Bacillus sphaericus</i>	1	<i>Bacillus subtilis</i>	1	<i>Bacillus sphaericus</i>	2
<i>Klebsiella</i> sp.	1	<i>Kurthia gibsonii</i>	1	<i>Bacillus subtilis</i>	3
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	1			<i>Cellulomonas</i> sp.	1
<i>Ralstonia</i> sp.	1			<i>Chryseomonas</i> sp.	2
<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	1			<i>C. afermentans</i> *	1
				<i>Escherichia coli</i>	1
				<i>Kurthia gibsonii</i>	2
				<i>Xanthomonas axonopodis</i>	2
				<i>Xanthomonas citri</i>	1
Total de isolados	37		49		47
Índice de Shannon (H ²)	0,27		0,04		0,41

I=isolados; **Corynebacterium afermentans*.

A presença significativa de bactérias Gram positivas em detrimento das Gram negativas em todos os locais coletados é um resultado confirmado pela literatura. De acordo com SILVA et al. (2005), apenas 7% da população bacteriana do solo estão representadas por bactérias Gram negativas aeróbias/anaeróbias facultativas.

Observou-se também que, independente do solo de cada tipo vegetacional, houve um predomínio de espécies do gênero *Bacillus*, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Isso se deve ao fato de que o solo, por ser um ambiente passível de constante estresse ambiental, torna-se inóspito para espécies de microrganismos que não apresentam mecanismos de defesa contra dessecação ou escassez nutricional. Como o gênero *Bacillus* tem a capacidade de produzir endósporos em condições ambientais desfavoráveis, ele é selecionado em detrimento de outros microrganismos, e, portanto, predomina no solo.

Outra propriedade importante das espécies de *Bacillus*, citado por GARDENER (2004), é a capacidade de produzir diversos compostos extracelulares, como, por exemplo, antibióticos, que inibem o crescimento de outros microrganismos. Essa vantagem gera uma seleção do grupo *Bacillus*, o que pode explicar sua abundância nos 3 pontos de coleta.

Tabela 5. Correlação do Índice de Shannon com os valores de CTC, P, K e Ca do solo em São Sebastião do Caí.

	CTC	P	K	Ca
	Coeficiente de correlação (R)			
Índice de Shannon (H')	0,51	0,18	0,50	0,62

Ao final, realizando a correlação entre o Índice de Shannon e algumas propriedades químicas do solo (Tabela 5), pôde-se observar uma correlação moderada com a CTC, bem como com a quantidade de potássio e cálcio no solo.

Entretanto, uma fraca correlação foi observada com a quantidade de fósforo, possivelmente pelas mesmas razões expressas na correlação com a porcentagem de matéria orgânica, anteriormente citada.

Advinda da presença significativa de espécies do gênero *Bacillus*, observou-se grande atividade enzimática para a maioria das enzimas testadas nos três locais coletados (Figura 7).

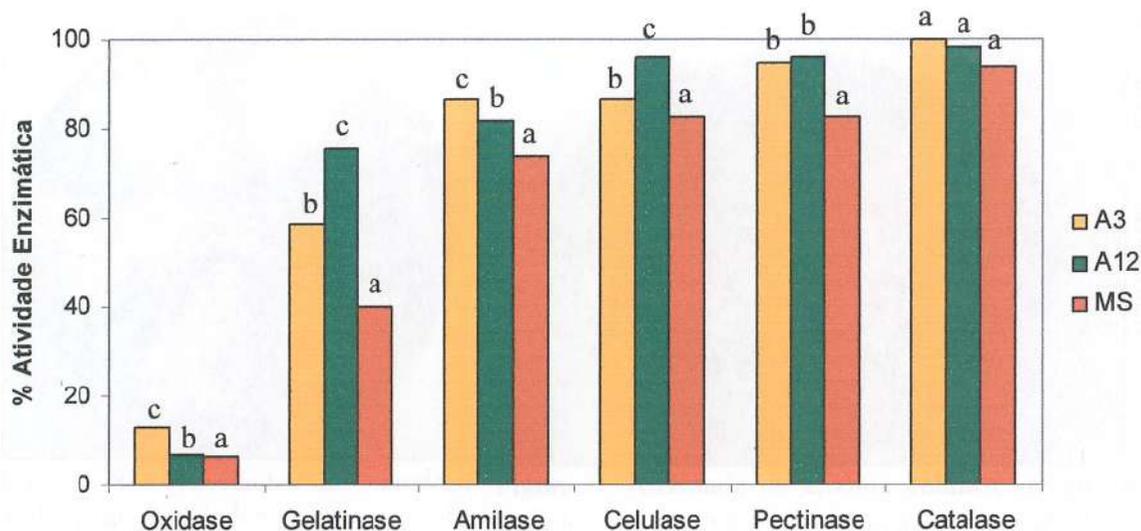
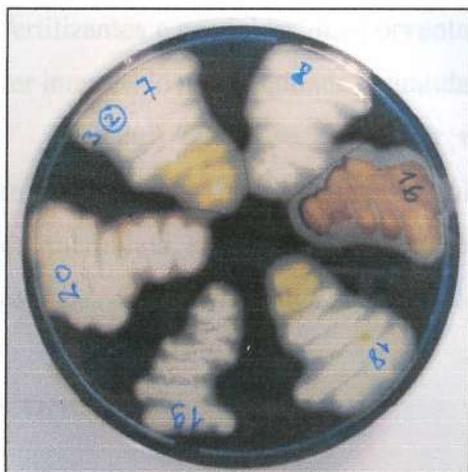


Figura 7. Porcentagem de atividade enzimática do total dos isolados do solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos (A3), de doze anos (A12) e da mata secundária (MS) em São Sebastião do Caí. As letras semelhantes não diferem entre si pelo Índice DMS ao nível de 5% de probabilidade.

O solo do cultivo de acácia-negra de 3 anos foi o local que apresentou a maior porcentagem de microrganismos com atividade para as enzimas oxidase e amilase (Figura 9). O solo do povoamento de acácia-negra de doze anos continha a maior porcentagem de isolados com atividade enzimática para as enzimas gelatinase e celulase (Figura 8). Os mesmos resultados das enzimas podem ser explicados em relação à porcentagem de isolados de *Bacillus* nas três formações vegetais analisadas, devido à relação direta entre a presença desse gênero e a atividade enzimática.

A enzima catalase não apresentou diferença estatística dos microrganismos de todos os locais de coleta, enquanto que a pectinase obteve a maior porcentagem de microrganismos com atividade enzimática nos 2 cultivos de acácia-negra, em relação à mata secundária.



Fonte: A autora.



Fonte: Mariana Wanderley Duarte.

Figura 8. Atividade da enzima amilase de 6 isolados do povoamento de acácia-negra de 3 anos, onde todos são positivos (halo ao redor das colônias).

Figura 9. Atividade da enzima celulase de cinco isolados do povoamento de acácia-negra de três anos, onde quatro são positivos (halo ao redor das colônias).

Contrariamente aos resultados esperados que relacionem tipo de cobertura vegetal com a atividade enzimática dos microrganismos do solo, a mata secundária, que contém a maior quantidade de resíduos vegetais e conseqüentemente se esperaria uma maior atuação das enzimas extracelulares dos microrganismos, observou-se a menor porcentagem de isolados com atividade enzimática para as enzimas testadas.

Dois fatores principais podem ter influenciado para a ocorrência desse paradoxo: o primeiro, pela presença de menor porcentagem de bactérias do gênero *Bacillus* na mata secundária em relação aos dois povoamentos de acácia-negra, pois se sabe, pela literatura, que este gênero apresenta uma alta atividade enzimática para diversas enzimas; o segundo, pela realização de uma suposta adubação pelo proprietário nas culturas de acácia-negra. De acordo com NAYAK et al. (2007), as maiores atividades enzimáticas são encontradas nos tratamentos adubados, possivelmente devido ao estímulo que a adubação pode causar à população microbiana.

Os resultados do número de UFC, diversidade microbiana e atividade enzimática por vezes discordantes dos pontos que continham atividade agrícola em relação à área florestal, devem-se a diversos fatores. Regime de umidade do solo, temperatura e entrada de resíduos orgânicos nos diferentes locais, sobretudo substâncias químicas por meio de

fertilizantes e pesticidas que porventura foram usados nos cultivos de acácia-negra, podem ter interferido na quantidade e qualidade dos microrganismos isolados.

Outro fato a se considerar é a metodologia empregada para o isolamento dos microrganismos (meios de cultura utilizados, tempo de incubação, temperatura, competição da microbiota, entre outros), que acabaram selecionando grupos específicos, especialmente espécies de *Bacillus*, talvez não informando a real diversidade do solo nos locais de coleta.

CONCLUSÕES

- Na mata secundária foram encontrados os parâmetros químicos mais adequados para o crescimento da vegetação, bem como a maior diversidade de microrganismos, logo, pode-se afirmar que a mata secundária apresenta características químicas e microbiológicas que se assemelham a um solo de melhor qualidade. Portanto, os resultados confirmam a hipótese de que a vegetação apresenta influência sobre a diversidade da microbiota do solo.

- A diversidade de microrganismos e a porcentagem de matéria orgânica podem estar relacionadas ao maior teor de minerais no solo, pois apresentaram uma correlação de moderada a forte para a CTC e os nutrientes K e Ca.

- Nos três pontos coletados, a atividade enzimática está relacionada, em sua maior parte, à quantidade de microrganismos do gênero *Bacillus*, e não o tipo de cobertura vegetal. Portanto, a análise da atividade enzimática, neste trabalho, deve ser observada através da porcentagem de *Bacillus* presentes em cada ponto de coleta, e não com o tipo de vegetação.

Os microrganismos isolados, principalmente os que são representados pelo gênero *Bacillus*, por apresentarem uma alta atividade enzimática, podem ser estudados futuramente como potencial biotecnológico para a indústria, tanto para fins farmacêuticos quanto alimentícios. Do mesmo modo, essas bactérias podem ser utilizadas para fins ambientais e agrícolas, como na recuperação de áreas degradadas em associação com as plantas com o objetivo de aumentar o teor de matéria orgânica no solo e promover o crescimento vegetal.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela exemplar qualidade de ensino e pesquisa, a minha orientadora, Dra. Sueli Van Der Sand, meus colegas de laboratório, minha família e à família Laux, pela disponibilização da área de estudo e carinho. A todos, meu muito obrigada.

REFERÊNCIAS

ANGHINONI, I.; BISSANI, C.A.; Fósforo e Adubos Fosfatados In: BISSANI, C. et al. **Fertilidade dos Solos e Manejo da Adubação de Culturas**, Porto Alegre: Gênese, 2004. 328p.

ANGERS, D.A. et al. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Canadian Journal of Soil Science**, v.73, p.39-50, 1993.

BETTELHEIM, K. A. Biochemical characteristics of *E. coli*. In: **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Ed Gyles, C. L.: Guelph, CAB, p.3-30, 1994.

BLUM, W.E.H.; SANTELISES, A.A. A concept of sustainability and resilience based in soil functions. In: GREENLAND, D. J.; SZABOLCS, I. (Org.) **Soil resilience and sustainable land use**. Wallingford : CAB, p.535-542, 1994.

BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, n.1, p.13-24, 2000.

CALDEIRA, M.V.W. et al. Quantificação de biomassa acima do solo de *Acácia mearnsii* De Wild., procedência Batemans Bay, Austrália. **Ciência Florestal**, v.11, p.79-91, 2001.

CESTESB. Propriedades do solo. **Solo**. São Paulo. Capturado em 25 out. 2008. Online. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/propriedades.asp>.

DICK, R.P. Soil enzymes activities as integrative indicator of soil health. In: NKHURST C. et al. (Org) **Biological indicators of soil health**. New York: CAB, p.121-155, 1997.

DORAN, J.W. et al. Soil health and sustainability. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.56, p.2-54, 1996.

GARDENER, B.B.M.; Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. In: Symposium: The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. **Phytopathology**. v.94, p.1252-1258, 2004.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994. 787p.

KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E. A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 3 ed. Oxford : Elsevier, p.53-83, 2007.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 912p.

MAJER, R.M. et al. **Environmental microbiology**. 1 ed. Canadá : Academic Press, 2000. 585p.

MALAVOLTA, E. et al. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1989. 201p.

MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. 2 ed. Porto Alegre : Gênese 2004. 290p.

MIYAUCHI, M.Y.H. **Propriedades microbiológicas e bioquímicas do ciclo do carbono em solos sob diferentes coberturas vegetais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras : UFLA, 2002. 626p.

NANNIPIERI, P. et al. Hydrolases extracted from soil: their properties and activities. **Soil Biological Biochemistry**, v.14, p.257-263, 2005.

NAYAK, D.R. et al. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology and Biochemistry**. v.39, p.1897-1906, 2007.

POMPÉIA, S.L. Procedimentos técnicos para recuperação de áreas degradadas por poluição. In: I SIMPÓSIO SUL- AMERICANO E II SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. 1994, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...**Curitiba : Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1994. 679p. p.63.

RODRIGUES, W.C. **DivEs - Diversidade de espécies. Versão 2.0**. Software e Guia do Usuário, 2005. Capturado em 01 out. 2008. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br>.

SILVA, P. et al. Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo. **Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.245-251, 2005.

SOUCHIE, E.L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v.35, n.2, mai/ago, 2005.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v.114, n.3/4, p.143-144, 2003.

TAYLOR, J.P. et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.34, p.387-401, 2002.

ZILLI, J.E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, p.391-411, set/dez, 2003.